UNTERSUCHUNGEN ZU LOKALEN UNSPEZIFISCHEN ABWEHRSTÖRUNGEN BEI CHRONISCH REKURRIERENDEN HARNWEGSINFEKTIONEN JUNGER MÄDCHEN

Karlheinz HOFMANN

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

UNTERSUCHUNGEN ZU LOKALEN UNSPEZIFISCHEN ABWEHRSTÖRUNGEN BEI CHRONISCH REKURRIERENDEN HARNWEGSINFEKTIONEN JUNGER MÄDCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karlheinz HOFMANN
aus München

München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Marget
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Betke
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 4. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D a n k s a g u n g

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Marget neben der Überlassung des Themas vor allem für die stets gleichbleibend freundliche Ansprechbarkeit und Unterstützung, sowie das große Interesse an den Fortschritten meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Töpfer vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München, jetzt an der Dermatologischen Universitätsklinik, die es mir ermöglichte, die biochemischen Untersuchungen am Max-Planck-Institut durchzuführen und sich meiner Probleme stets aufgeschlossen und hilfsbereit annahm.

Im weiteren bin ich den zahlreichen Damen und Herren der Abteilung Proteinchemie I am Max-Planck-Institut für die Einarbeitung zu Dank verpflichtet, sowie Frau Anna Macellaro von der Kinderklinik für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den Attachment-Untersuchungen.

K u r z g l i e d e r u n g

(ausführliche Inhaltsangabe S. II - IV)

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ALLGEMEINER TEIL MIT DARSTELLUNG DER UNTERSUCHUNGSVORHABEN	3
2.1. Einführung in die Fragestellung	3
2.2. Untersuchungsvorhaben dieser Arbeit	11
2.3. Prinzipien und Methoden bisheriger Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung	12
3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. Periurethralflora	17
3.2. Biochemische Untersuchungen	21
3.3. Biologischer in-vitro-Attachment-Test	38
4. ERGEBNISSE	43
4.1. Orientierungsuntersuchung: Bestimmung der Periurethralflora	43
4.2. Eigene neue Untersuchungen	51
4.2.1. Untersuchung der höhermolekularen Urinbestandteile	51
4.2.1.1. Grobe biochemische Charakterisierung	51
4.2.1.2. Versuch einer weiteren Auftrennung	57
4.2.2. Suche nach Unterschieden zwischen den hochmolekularen Urinbestandteilen gesunder Mädchen und kranker Mädchen im schubfreien Intervall	65
4.2.2.1. Suche nach biochemischen Unterschieden	65
4.2.2.2. Biologischer in-vitro-Attachment-Test	76
5. DISKUSSION	79
6. ZUSAMMENFASSUNG	103
7. LITERATUR	105

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. ALLGEMEINER TEIL MIT DARSTELLUNG DER UNTERSUCHUNGSVORHABEN 3

2.1. Einführung in die Fragestellung 3

2.1.1. Lokale Abwehrschwäche - periurethrale Bakterienflora 3
2.1.2. Antibakterielle Aktivität der Harnblase 4
2.1.3. Antibakteriell wirkende Glykoproteine am Beispiel Speichel 6
2.1.4. Glykoproteine im Urin 6
2.1.5. Biologische Bedeutung von Sialsäure 7
2.1.6. Zelluläre Interaktion Bakterium - Epithelzelle 8
2.1.7. Aspekte einer vergleichenden Urinuntersuchung zwischen Gesunden und Kranken 9

2.2. Untersuchungsvorhaben dieser Arbeit 11

2.3. Prinzipien und Methoden bisheriger Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung 12

2.3.1. Untersuchungen der Periurethralflora 12
2.3.2. Untersuchungen von Urin und Vaginalsekret 12
2.3.3. In-vitro-Tests über Bakterienattachment 15

3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN 17

3.1. Periurethralflora 17

3.1.1. Patienten 17
3.1.2. Keimbestimmung der Mittelstrahlurine 18
3.1.3. Abstrichmethode 19
3.1.4. Bakteriologische Bestimmungen 20

3.2. Biochemische Untersuchungen 21

3.2.1. Material 21
3.2.2. Methoden 23
3.2.2.1. Säulenchromatographie 23
3.2.2.1.1. Orientierungs- und Bereitstellungschromatographie an Sephadex G 50 sf 23
3.2.2.1.1.1. Sephadex G 50 sf zur groben biochemischen Orientierung 23
3.2.2.1.1.2. Sephadex G 50 sf zur Materialgewinnung für die vergleichenden Untersuchungen 24
3.2.2.1.2. Chromatographie der hochmolekularen G 50 sf - Fraktion (G 50/1) 25

3.2.2.1.2.1. Gelchromatographie an Sephadex G 150 und G 200 25
3.2.2.1.2.2. Ionenaustauschchromatographie an CM 23 - Cellulose 25
3.2.2.1.2.3. Chromatographie an Sepharose 4 b 25
3.2.2.1.2.4. Ionenaustauschchromatographie an DEAE - Sepharose 26
3.2.2.1.2.5. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE - Cellulose 26
3.2.2.1.2.6. Affinitätschromatographie an Concanavalin A - Sepharose 27
3.2.2.1.2.7. Sepharose 4 b - Chromatographie von den beiden Con A - Peaks 27
3.2.2.1.3. Entsalzung an Sephadex G 10 28
3.2.2.2. Bestimmung der Sialsäure 29
3.2.2.2.1. Quantitative Sialsäurebestimmung mit Thiobarbitursäure 29
3.2.2.2.2. Qualitative Sialsäurebestimmung mit Resorcinol 30
3.2.2.3. Zuckerbestimmung 31
3.2.2.3.1. Gesamtzuckerbestimmung mit Orcin 31
3.2.2.3.2. GLC von Hexosen und Hexosaminen 32
3.2.2.4. SDS - Gelelektrophoresen 34
3.2.2.5. Aminosäureanalysen 35
3.2.2.6. N-terminale Aminosäuresequenzanalyse 36
3.2.2.6.1. Manuelle Sequenzanalyse 36
3.2.2.6.2. Automatische Sequenzanalyse 37
3.2.2.6.3. Identifizierung der PTH-Aminosäuren 37
3.3. Biologischer in-vitro-Attachment-Test 38
3.3.1. Untersuchungsmaterial 38
3.3.2. Methode 39
4. ERGEBNISSE 43
4.1. Orientierungsuntersuchung: Bestimmung der Periurethralflora 43
4.1.1. Mittelstrahlurine 43
4.1.2. Periurethralflora 44

4.2. Eigene neue Untersuchungen 51

4.2.1. Untersuchung der höhermolekularen Urinbestandteile 51

4.2.1.1. Grobe biochemische Charakterisierung 51

4.2.1.1.1. Sephadex G 50 sf - Gelchromatographie 51
4.2.1.1.2. Proteinverteilung 52
4.2.1.1.3. Zuckerverteilung 53
4.2.1.1.4. Sialsäureverteilung 54
4.2.1.1.5. Elektrolytgehalt 54
4.2.1.1.6. Bestimmung der Heterogenität von G 50/1 und G 50/2 mit N-terminaler Aminosäureanalyse 55

Zusammenfassung der Ergebnisse 56

4.2.1.2. Versuch einer weiteren Auftrennung des hochmolekularen Sephadex G 50 sf - Peaks 57

4.2.1.2.1. Gelchromatographie mit Sephadex G 150 und G 200 57
4.2.1.2.2. Ionenaustauschchromatographie an CM 23 - Cellulose 58
4.2.1.2.3. Ionenaustauschchromatographie an DEAE - Sepharose 58
4.2.1.2.4. Chromatographie auf Sepharose 4 b 59
4.2.1.2.5. Ionenaustauschchromatographie an DEAE - Cellulose 60
4.2.1.2.6. Affinitätschromatographie mit Concanavalin A - konjugierter Sepharose 61
4.2.1.2.7. Sepharose 4 b - Chromatographie der Con A - Peaks 63

Zusammenfassung der Auftrennungsversuche 64

4.2.2. Suche nach Unterschieden zwischen den hochmolekularen Urinbestandteilen gesunder Mädchen und kranker Mädchen im schubfreien Intervall 65

4.2.2.1. Suche nach biochemischen Unterschieden 65

4.2.2.1.1. Quantitative Sialsäurebestimmung 65
4.2.2.1.2. Zuckeranalysen 66
4.2.2.1.3. Elektrophoresen 67
4.2.2.1.4. N-terminale Aminosäurebestimmungen 70

Zusammenfassung der biochemischen Untersuchungen auf Unterschiede 75

4.2.2.2. Biologischer in-vitro-Attachment-Test 76

5. DISKUSSION 79

6. ZUSAMMENFASSUNG 103

7. LITERATUR 105

Verzeichnis der Abkürzungen

HWI	Harnwegsinfektion
Schub	akute Infektion mit über 10^5 Bakterien pro ml Urin bei chronisch rekurrierenden Harnwegsinfektionen
schubfrei	Intervall zwischen 2 Schüben mit unter 10^3 Bakterien pro ml
E.coli	Escherichia coli
Sephadex G 50 sf	Sephadex G 50 super fine
G 50/1	1. Peak bzw. 1. Bereich der Sephadex G 50 sf - Chromatographie des dialysierten und lyophilisierten Urins
G 50/2	Zwischenstück bzw. 2. Bereich der Sephadex G 50 sf - Chromatographie
G 50/3	2. Peak bzw. 3. Bereich der Sephadex G 50 sf - Chromatographie
Con A/1	1. Peak der Chromatographie von G 50/1 an Concanavalin A - konjugierter Sepharose
Con A/2	2. Peak der Chromatographie von G 50/1 an Concanavalin A - konjugierter Sepharose
Sialsäure	N-Acylneuraminsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PTC	Phenylisothiocyanat

1. Einleitung

Die Pathogenese der chronisch rekurrierenden, nicht obstruktiven Harnwegsinfektionen im Kindesalter ist bis heute weitgehend ungeklärt.

Durch Typisierung der mit 70 - 90 % an Harnwegsinfektionen (HWI) beteiligten Escherichia coli hat man nachweisen können, daß die ständig wiederkehrenden Infektionen in der großen Mehrzahl kein Wiederaufflammen eines latent schwelenden Entzündungsherdes sind, sondern Neuinfektionen mit neuen Erregern (7,46). Besonders bei Kindern ist der Anteil der Neuinfektionen mit 83 % sehr hoch (Krankengut unserer Harnwegssprechstunde).

Rekurrierende HWI sind also nicht Folge einer einmaligen Entzündung, vielmehr bekommen die Patienten immer wieder neue Entzündungen, müssen eine Disposition haben. Diese Disposition dürfte von besonderer immunologischer Art sein und nur den unteren Harntrakt betreffen, da sich bei der allgemeinen Abwehrsituation keine Schwäche erkennen läßt und Untersuchungen der lokalen immunologischen Verhältnisse keine Defekte der zellulären und humoralen Abwehr nachweisen konnten.

Der aszendierende Infektionsweg wird heute allgemein akzeptiert, ca. 70 % der HWI betreffen nur den unteren Harntrakt (26).
Bei Frauen und Mädchen, die den weit überwiegenden Teil der Patienten mit nichtobstruktiven HWI stellen, gelangen offensichtlich die potentiell pathogenen Keime aus dem Darm in den Bereich des Orificium urethrae externum, von wo aus bei den disponierten

Patienten der Bakterienaufstieg ins harnableitende System gelingt. Wie hier eine Aszendenz gegen den Harnstrahl möglich ist, ob dafür ein verstärktes Attachment, d.h. Anhaften der Bakterien am Harnröhrenepithel Voraussetzung ist, ob zur Vermehrung in der Harnblase das Attachment am Blasenepithel fördernd wirkt oder ob es umgekehrt notwendig ist zur Abtötung der Bakterien, ist praktisch ungeklärt.

2. Allgemeiner Teil mit Darstellung der Untersuchungsvorhaben

2.1. EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG

2.1.1. Lokale Abwehrschwäche - periurethrale Bakterienflora

Bei einem aszendierenden Infektionsweg liegt die Frage nach der Bedeutung der primären bakteriellen Besiedelung an der Harnröhrenmündung nahe; man hat in den letzten 10 Jahren in einer Reihe von Arbeiten (11,12,18,21,26,28,44,47,56,71,72,74) die periurethrale Flora an uropathogenen Keimen bei weiblichen Probanden untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind widersprüchlich, besonders jedoch Stamey (71,74) wies immer wieder auf die stärkere Besiedelung mit Darmbakterien bei harnwegsinfektdisponierten Frauen hin.

1976 erschienen zwei Arbeiten der schwedischen Arbeitsgruppe Bollgren/Winberg (11,12), die mit einer relativ gut quantitativen Methode zuerst die Periurethralflora gesunder Kinder bestimmten und anschließend 13 Mädchen mit rekurrierenden HWI bis zum Auftreten der Infektion täglich untersuchten. Sie fanden bei gesunden Mädchen ab 5 Jahren eine minimale Besiedelung mit Enterobakterien, während bei den kranken Patientinnen ab etwa einer Woche vor Auftreten der Infektion die Periurethralregion dicht besiedelt war. Diese 13 Mädchen scheinen - soweit wir die Literatur überblicken - die einzigen bisher untersuchten kranken Kinder zu sein.

Im ersten Teil unserer Untersuchungen soll die Periurethralflora an einer größeren Zahl von Mädchen überprüft werden, allerdings nicht in einer Longitudinalstudie, sondern vergleichend die 3 Gruppen

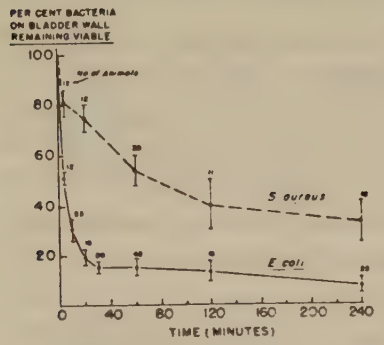
gesund - krank im schubfreien Intervall - krank im akuten Schub. Besonders soll auch das Auftreten von Enterokokken als Begleitflora untersucht werden, denen Stamey (bei Erwachsenen) eine gewisse bahnende Rolle zumißt (74). Ob es sich bei den rekurrierenden HWI im Kindesalter ätiologisch um die gleiche Krankheit handelt, ist noch keineswegs entschieden (Kienitz, Hahnenklee (43)).

Falls sich ein Unterschied in der periurethralen Besiedelung bestätigen ließe, würde dies die These einer lokalen Abwehrschwäche stützen, die auch Bollgren und Winberg am Ende ihres Artikels über die Periurethralflora bei disponierten Mädchen zur Diskussion stellen (12): "Es ist anzunehmen, daß eine zeitweise Veränderung der Zellphysiologie oder Zellwandstruktur am Bakterium oder der Epithelzelle die wechselnde pathologische periurethrale Kolonisation im Vestibulum und die nachfolgende Infektion verursachen." Außerdem stellen sie fest, daß Beschmutzung oder Kontamination keine Rolle zu spielen scheinen, was für einen lokal wirkenden Klärungsmechanismus spricht.

2.1.2. Antibakterielle Aktivität der Harnblase

Daß die Harnblasenwand eine antibakterielle Wirkung aufweist, haben Norden, Green und Kass 1968 an Schweine- und Rattenblasen mit radioaktiv markierten Bakterien nachgewiesen (54). Nach 30 Minuten war die Zahl der nach Inokulation und Entleerung an der Blasenwand anhaftenden E.coli und Proteus mirabilis um 85 % reduziert, während die Zahl von Staph.aureus

nach 1 Std. nur um 46 % reduziert war, in manchen Fällen sogar zugenommen hatte, was für eine gewisse Spezifität eines bei E.coli und Proteus mirabilis recht wirkungsvollen Abwehrmechanismus spricht. An der excidierten Blase sank die Zahl der Bakterien erst schnell, dann nicht mehr.



Bacterial killing by bladder wall.

Außerdem scheint der antibakterielle Mechanismus eine begrenzte Kapazität zu haben. Lymphozyten und Granulozyten fand man nicht. Antikörper scheinen keine entscheidende Rolle zu spielen, weil vorherige spezifische Immunisierung keinen Einfluß hatte. Die Autoren fordern als Erklärung für diese Beobachtungen eine bisher undefinierte antibakterielle Substanz auf der Blasenmukosa, vielleicht eine organische Säure, die in der intakten Blase ständig nachproduziert wird und eine bestimmte begrenzte Kapazität hat.

Sieben Jahre vorher hatten schon Cox und Hinman (22) eine antibakterielle Aktivität der Harnblase postuliert. Sie instillierten 4 freiwilligen gesunden jungen Männern per Katheter eine E.coli-Suspension und bestimmten Keimzahl und -konzentration im abgegebenen Urin. Beide nahmen ab, nach 72 Stunden waren keine Keime mehr nachweisbar, während sich im Urin derselben Personen in vitro die Bakterien stark vermehrten.

2.1.3. Antibakteriell wirkende Glykoproteine am Beispiel Speichel

Im Mund ist man bei der Erforschung der antibakteriellen Mechanismen ein Stück weiter: An den Wangenepithelzellen finden sich trotz ständiger Exposition nur wenige Bakterien. Wenn diese Epithelzellen jedoch gewaschen und in vitro mit Streptokokken inkubiert werden, haften sich nach einer Stunde Hunderte an (27,34,87).

Diese Klärwirkung beruht auf zwei Mechanismen: den IgA-Antikörpern und den Speichel-Glykoproteinen. Die hochmolekularen Speichelglykoproteine können sich spezifisch an bestimmte Bakterien binden und dadurch die Adsorption von beispielsweise Streptokokken verhindern oder die Desorption erleichtern. Sie scheinen eine große antigenetische Ähnlichkeit mit Proteinen auf den Mukosazellen aufzuweisen. Dadurch binden sie die Bakterien ebenso wie die Rezeptoren der Zelloberflächen und verdrängen sie von den Epithelzellen.
Hiermit ließe sich auch die Beobachtung erklären, daß bei manchen Krankheiten eine veränderte Glykoproteinsynthese mit einer höheren Anfälligkeit für Infektionen einhergeht (zitiert in (15)).

In einer anderen Arbeit werden Faktoren im Speichel beschrieben, die Bakterien zum Aggregieren bringen können (42).

2.1.4. Glykoproteine im Urin

Bereits 1954 beschrieben Anderson und Maclagan (4) bei einer quantitativen Bestimmung der Urin-

'mucoproteine' einen signifikanten Geschlechtsunterschied (146 mg/24 Std. beim Mann gegenüber 106 mg/24 Std. bei der Frau), was in Anbetracht der unterschiedlichen anatomischen und physiologischen Verhältnisse nicht von Bedeutung sein muß, aber im Hinblick auf das seltene Auftreten von primären HWI beim Mann von Bedeutung sein kann.

Auf antibakteriell wirkende Glykoproteine im Sinne der Gibbons'schen Speichelglykoproteine ist Urin bisher nicht untersucht worden, doch ist bekannt, daß das Übergangsepithel des Harntrakts von komplexen Carbohydraten bedeckt und bemerkenswert reich an Sialsäure ist (17,40). Aus der Erkenntnis, daß die Zelloberfläche des Harntraktübergangsepithels von einer dicken Glykokalix bedeckt ist, leitet Candiotti (17) ab, daß die Glykokalix die Quelle bestimmter Urincarbohydrate ist, wie z.B. des Tamm-Horsfall-Mukoproteins (29,36,53,84), das bei Entzündungen des Harntrakts vermehrt im Urin auftritt (13). Auch bei manchen anderen Infektionen sind Urin-Glykoproteine erhöht (4).

2.1.5. Biologische Bedeutung von Sialsäure

Die Aktivität bestimmter biologisch aktiver Glykoproteine hängt von ihrem Gehalt an Sialsäure ab (17,35), auch die Fähigkeit bestimmter Glykoproteine, Virushämagglutination zu verhindern, wird mit ihrem Sialsäuregehalt in Verbindung gebracht (89).
Vor kurzem stellte Schauer (61) fest, daß Acylneuraminsäuren (= Sialsäuren) die antigenetisch wirksamen Stellen in löslichen Makromolekülen und

Zellmembranen abzuschirmen vermögen. So werden z.B. die immunochemischen Reaktionen von manchen gesunden (z.B. Trophoblastzellen), sowie von carcinomatös entarteten Zellen vermindert (60).

Holmgren und Smith (41) erwähnen die Möglichkeit, daß die negativ geladene E.coli-Kapsel von den negativ geladenen hydrophilen Oberflächenstrukturen des Wirts, darunter Sialsäuren, abgestoßen werden könnte, was der Grund für den antibakteriellen Schutz der Harnblase sein könnte.
Behandlung der Harnblase von Schweinen mit Sialidase führt zu wesentlich verstärktem Attachment von gramnegativen Darmbakterien (82). Ebenso steigert Sialidasebehandlung von Makrophagen die bakterielle Adhärenz und Phagozytose (2,41).

2.1.6. Zelluläre Interaktion Bakterium - Epithelzelle

Das Bakterienattachment wird offensichtlich von einer Interaktion zwischen Bakterienoberfläche und Zelloberfläche bestimmt.

Die bakterielle Beteiligung am Attachment sieht man z.B. an der Tatsache, daß virulente Shigella und E.coli-Stämme am Dünndarmepithel besser haften als avirulente. Für die Virulenz von pathogenen E.coli ist die Adhäsion essentiell. Bestimmte virulente E.coli besitzen auf langen Filamenten das sog. K 88-Antigen, das beim Anhaften an der Darmmukosa eine Rolle spielt.

Die Beteiligung der Wirtszelle erklärt z.B. den Gewebstropismus bestimmter Bakterien. So wiesen Ellen und Gibbons (27) nach, daß sich an der Rattenzunge S.pyogenes in höherer Zahl anhaften als E.coli.

An der Harnblase sind die Verhältnisse umgekehrt. An menschlichen Rachenzellen haftet S.pyogenes besser als E.coli.
Offenbar scheinen für bakterielles Attachment somit bestimmte Oberflächenstrukturen essentiell zu sein, die ihrerseits auf der Mukosa eine Entsprechung brauchen. Da die bakteriellen Eigenschaften immer in nahezu gleicher Weise vorhanden sind, ist bei Patienten mit starker Infektionsgefährdung eine Veränderung in der Mukosaoberflächenstruktur vorstellbar. So ist für die Spezifität der Interaktion zwischen Bakteriophagen und Bakterium die Bedeutung eines Membran-Glykolipides nachgewiesen (Robbins, zit. als (75) in (89)).
Es ist nun denkbar, daß im Rahmen des natürlichen Turnover Glykokalixbestandteile der Mukosa abgeschilfert werden und im Urin erscheinen, bei Kranken also auch evtl. pathologische Glykokalixbestandteile, etwa mit erniedrigtem Sialsäuregehalt.

2.1.7. Aspekte einer vergleichenden Urinuntersuchung zwischen Gesunden und Kranken

Einer vergleichenden Urinuntersuchung zwischen Gesunden und Kranken kann man somit folgende Arbeitshypothesen zugrunde legen:

a) Auch im Harntrakt gibt es ein bakterienbindendes Glykoprotein, wie es die Arbeitsgruppe um Gibbons (27,34,87) und Kashket und Donaldson (42) im Speichel beschrieben haben. Diese Substanz ist bei disponierten Personen erniedrigt.

b) Bei infektdisponierten Personen weist der Urin gegenüber den Gesunden eine andere Zusammensetzung besonders der Glykoproteine auf als Ausdruck einer pathologisch veränderten Glykokalix der Harnwegsmukosazellen.

c) Bei Patienten mit rekurrierenden HWI tritt im Urin ein bakterienwachstumsbegünstigender Faktor auf.

Die erste Hypothese läßt sich gut in vitro in einem Attachment-Test überprüfen, indem man zu Bakterien und Epithelzellen vom selben Spender Urinbestandteile von Gesunden und Kranken gibt und den Einfluß auf das Attachment vergleichend prüft.

2.2. UNTERSUCHUNGSVORHABEN DIESER ARBEIT

Zusammenfassend seien die Untersuchungsvorhaben der vorliegenden Arbeit kurz dargestellt:

a) Bestimmung und Vergleich der bakteriellen Periurethralbesiedelung bei gesunden Mädchen und Patientinnen im schubfreien Intervall und akuten Schub

b) Grobe biochemische Charakterisierung der Urinbestandteile und Versuch einer materialerhaltenden Auftrennung, ohne etwaige biologische Aktivitäten zu zerstören, um ggf. biologische Wirkungen auch kleiner Fraktionen testen zu können

c) Suche nach biochemischen Unterschieden zwischen den hochmolekularen Urinbestandteilen von Gesunden und Kranken

d) Vergleichende Untersuchung des Einflusses höhermolekularer Urinbestandteile von Gesunden und Kranken auf das Attachment von Bakterien an Urinepithelzellen im in-vitro-Versuch

2.3. PRINZIPIEN UND METHODEN BISHERIGER UNTERSUCHUNGEN MIT ÄHNLICHER FRAGESTELLUNG

2.3.1. Untersuchungen der Periurethralflora

Besonders die Vermutung einer lokalen Entstehung der chronisch rekurrierenden HWI führte, wie oben erwähnt, in den letzten 10 Jahren zu mehreren Untersuchungen der Periurethralflora bei Frauen, die unterschiedliche Ergebnisse erbrachten (18,26,28, 44,56,71,72,74).
Über Mädchen vor der Menarche wurden noch kaum Untersuchungen veröffentlicht (11,12,44); als einzige Kranke dieser Altersgruppe wurden 13 Mädchen von Bollgren und Winberg (12) untersucht.

Die 'Abstriche' wurden in der Regel mit einem getränkten Wattetupfer entnommen, verdünnt und angezüchtet.
Bollgren und Winberg entnahmen die Periurethralbakterien mit einem Gelatinestempel mit stets gleichem Querschnitt, wodurch ein grober quantitativer Vergleich möglich wurde.
Diese Methode, die auch wir benützten, ist im experimentellen Teil genau beschrieben.

2.3.2. Untersuchungen von Urin und Vaginalsekret

Die Frage nach den Ursachen der von der Mehrzahl der Autoren festgestellten unterschiedlichen Periurethralbesiedelung ist ebenso offen wie die Frage der Pathogenese der HWI.

Die Forschergruppe um Stamey begann in den letzten Jahren mit einer Untersuchungsreihe, in der die verschiedenen Parameter des Vaginalsekrets unter-

sucht wurden.

Auch sie konnten an den spezifischen Abwehrmechanismen Antikörper und Leukozyten keine Unterschiede zwischen Frauen mit und ohne Harnwegsinfektanamnese finden. Die lokalen IgA- und IgG-Konzentrationen waren bei Kranken und Kontrollen gleich, auch zeigten sich keine Titerveränderungen bei Kolonisation mit wechselnden Serotypen von E.coli (67). Die Leukozytenzahlen waren bei Kranken und Kontrollen gleich, es bestand weder eine Abhängigkeit von der Bakterienbesiedelung noch vom Menstruationszyklus (70). Ebenfalls kein Unterschied und kein Zusammenhang mit einer Besiedelung durch potentiell pathogene Keime ließ sich an der nichtpathogenen Begleitflora nachweisen (30), womit bakterielle Interferenz als Erklärungsmodell ausscheidet.
Die Glykogenkonzentrationen im Vaginalsekret waren bei den beiden Gruppen gleich (73).
Zeigen ließ sich durch parallele pH- und Darmbakterienbestimmungen am Introitus vaginae eine geringere Besiedelungsdichte im saureren Milieu an E.coli, Proteus und Enterokokken (72); ob jedoch disponierte Frauen grundsätzlich ein alkalischeres Milieu aufweisen, kommt in dieser Arbeit nicht explizit zum Ausdruck.
Das Ergebnis, daß häufig uropathogene E.coli-Stämme bei Inkubation mit Vaginalsekret eine höhere Resistenz zeigen als nur selten beteiligte, bestätigt den bakteriellen Faktor (68), ebenso läßt sich das seltene Auftreten von Proteus- und Pseudomonas aeruginosa-Infektionen mit der höheren Empfindlichkeit dieser Erreger gegenüber Vaginalsekret erklären (69).
Als bisher interessantestes Ergebnis wird von Fowler

und Stamey (31) ein besseres E.coli-Attachment an Vaginalzellen von Patientinnen gegenüber gesunden Kontrollen beschrieben; das Ergebnis ist hochsignifikant, die Werte streuen jedoch zwischen 7 und 90 Bakterien pro Zelle bei den Patientinnen, zwischen 8 und 50 Bakterien pro Zelle bei den gesunden Kontrollen.

Auch aus Urinuntersuchungen liegen einzelne Daten vor. So wurde der Einfluß von Urin-pH und -osmolalität auf Bakterienwachstum und Phagozytose untersucht (5,19).
Andere Untersuchungen ergaben eine antibakterielle Aktivität des Prostatasekrets (66). Der Vergleich der IgG- und IgA-Antikörperkonzentrationen von Gesunden und Kranken ließ keine Unterschiede erkennen (55,67). Auch die Entfernung der T-Lymphozyten im Tierversuch hatte keine Änderung des Infektionsverlaufes zur Folge (32).

Boesken (9) verglich mit einer diskelektrophoretischen Methode das Proteinmuster bei verschiedenen Nierenerkrankungen unter dem Aspekt einer tubulären Proteinurie. Durch die Fragestellung bedingt wurden hier jedoch vor allem Molekülgrößen von 10 000 bis 70 000 untersucht, auf primäre Veränderungen unter den höhermolekularen Proteinen wurde weniger geachtet. Biochemische Arbeiten über höhermolekulare Urinbestandteile gibt es in großer Zahl (13). Mit einer Vielzahl verschiedener Methoden - Fällungen, Chromatographien, Elektrophoresen - wurden bis zu 50 Proteinfraktionen gefunden (13), doch stand hier das analytische Problem im Vordergrund; die Funktion der verschiedenen Proteine interessierte nur am Rande, deshalb wurde fast nur Urin von Gesunden untersucht

und oft denaturierend oder materialverbrauchend gearbeitet.

Eine vergleichende Untersuchung von Urinen, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, ist bisher nicht publiziert worden.

2.3.3. In-vitro-Tests über Bakterienattachment

Williams und Gibbons (87) wiesen die antibakterielle Wirkung der Speichelglykoproteine in einem in-vitro-Versuch nach. Sie inkubierten einen Streptokokkenstamm mit Speichelglykoproteinen und gaben Wangenepithelzellen dazu. Die an diesen Zellen haftende Bakterienzahl wurde schließlich lichtmikroskopisch ausgezählt.

Ein analoger Versuch über Uringlykoproteine und Harnwegsepithelien ist bisher nicht beschrieben. Bei der Entwicklung einer in-vitro-Untersuchungsmethode für bakterielles Attachment im harnableitenden System, die auch wir für unseren biologischen Test übernahmen, untersuchte Svanborg Edén (75) den Einfluß verschiedener Parameter wie Wachstumsphase der Bakterien, Osmolalität und pH des Inkubationsmediums, u.a., um die Methode zu optimieren. Von den höhermolekularen Urinsubstanzen wurde nur der Einfluß sekretorischer Immunglobuline getestet und dabei ein attachmenthemmender Effekt festgestellt (75). Bei vergleichenden Attachmentuntersuchungen von E.coli-Serotypen von akuten Pyelonephritiden, akuten Zystitiden, asymptomatischen Bakteriurien und aus dem Stuhl Gesunder wurden deutlich abnehmende Attachmentzahlen in der genannten Reihenfolge festgestellt (75,77,78). Bei einem Vergleich des

Attachments zwischen infizierender E.coli-Spezies und Epithelzellen von Kranken bzw. Gesunden zeigten die Epithelien der Patientinnen deutlich höhere Attachmentzahlen (75).
Die Attachmentversuche von Fowler und Stamey (31) wurden unter 2.3.2. erwähnt; auch diese Autoren beschrieben ein stärkeres Attachment an Vaginalzellen kranker Probandinnen.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. PERIURETHRALFLORA

3.1.1. Patienten

Bei 70 Mädchen im Alter zwischen 5 und 11 Jahren, jedoch niemals nach der Menarche, wurden insgesamt 93 mal Mittelstrahlurin und Periurethralabstrich entnommen, davon

30 mal im akuten Schub,
36 mal im schubfreien Intervall,
20 mal bei urologisch gesunden Patienten.

7 Patientinnen wurden aus unter 'Ergebnisse' genannten Gründen (Enterokokkeninfektionen, grampositive Stäbchen im Urin, zwischen 1000 und 100 000 gramnegative Darmbakterien im Urin) nicht in die Statistik aufgenommen.
Alle Patienten hatten seit mindestens 5 Tagen vor der Untersuchung keine Antibiotika zu sich genommen.
Bei den Mädchen mit rekurrierenden HWI handelte es sich um Patienten mit meist mehrjähriger Anamnese, mehreren Infektionen, die ambulant zur Routine-Urinkontrolle in unsere 'Pyelonephritis'-Sprechstunde kamen. Bei allen war radiologisch eine Obstruktion ausgeschlossen worden.
Die gesunden Mädchen waren ambulante Patientinnen unserer kinderchirurgischen Sprechstunde mit Platzwunden, Gipskontrollen o.ä. ohne Anamnese von urologischen Krankheiten oder Anzeichen für einen momentanen Infekt.

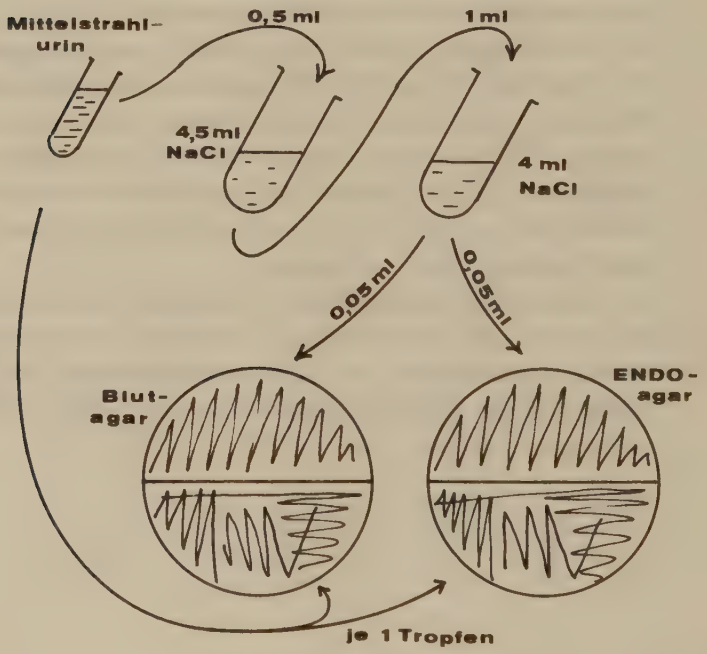
3.1.2. Keimbestimmung der Mittelstrahlurine

0,5 ml Mittelstrahlurin wurden zu 4,5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung gegeben und geschüttelt. Davon wurde 1 ml zu 4 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben; man erhielt eine Verdünnung 1 : 50.

Von dieser Lösung wurden je 0,05 ml auf je einer halben Blut- und ENDO-Agarplatte ausgestrichen und übernacht bei 37°C bebrütet. Jede Kolonie entsprach 1000 Bakterien pro ml Mittelstrahlurin.

Um genügend Material für die bakteriologischen Bestimmungen zur Verfügung zu haben, wurde zusätzlich je ein Tropfen unverdünnter Urin auf den anderen Hälften der Blut- und ENDO-Agarplatten ausgestrichen.

Schema der Bakterienbestimmung im Urin:



3.1.3. Abstrichmethode

Die aerobe periurethrale Bakterienbesiedelung wurde nach der Methode von Bollgren und Winberg (11) quantitativ bestimmt:
Eine 5 ml - Einmalspritze wurde mit 12-prozentiger flüssiger Gelatine (Merck) gefüllt und bei + 4°C aufbewahrt. Kurz vor Benützung wurde das Nadelende der Spritze abgeschnitten, die fest gewordene Gelatine etwas vorgeschoben und mit leichtem Druck kurz auf die Periurethralregion gepreßt (Querschnitt des Gelatine-Kolbens etwa 1,1 cm^2).
Eine schmale Scheibe entsprechend 0,2 ml Gelatine mit den Bakterien wurde abgeschnitten und 10 min. bei 37°C in 1,8 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst.
Die Lösung wurde kräftig geschüttelt und je 0,1 ml auf einer Blut- und einer ENDO-Agarplatte ausgestrichen.
Die Platten wurden 20 Stunden bei 37°C aerob bebrütet.
Zeigte sich kein Wachstum, wurden die Platten noch einmal 24 Stunden bebrütet.

Die Verdünnungen waren also so gewählt, daß jeder Kolonie auf den Agarplatten 20 Bakterien auf der Periurethralschleimhaut entsprachen.

Anmerkung: Die beschriebene Methode soll nicht den Anspruch erheben, die bakterielle Flora quantitativ exakt wiederzugeben, doch erlaubt sie einen quantitativen und auf jeden Fall einen qualitativen Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen.
Sicher dürfte die Zahl der am Abstrichstempel anhaftenden Bakterien von der Intensität und Dauer des Druckes, von der Oberflächenbeschaffenheit des Stempels, sowie von der Feuchtigkeit des Periurethralmilieus abhängig sein, doch treffen diese Faktoren für sämtliche Kinder in gleicher Weise zu.
Da das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchungen des Urins erst nach einem Tag vorlag, wurde die Abstrichentnahme bei den meist vorliegenden asymptomatischen Infektionen im Doppelblindversuch durchgeführt.

3.1.4. Bakteriologische Bestimmungen

Zur bakteriologischen Differenzierung wurde von jeder Kolonieart zuerst ein Grampräparat angefertigt.
Gramnegative, auf der ENDOplatte wachsende Stäbchen wurden dann mit der Enterotube Roche^{R} und gegebenenfalls den notwendigen Zusatzuntersuchungen klassifiziert.
Die verschiedenen E.coli-Serotypen konnten nur morphologisch nach der Kolonieform unterschieden werden.
Grampositive Kokken wurden bei nicht eindeutiger Koloniemorphologie noch einmal auf Agaragar angezüchtet und mit der Peroxidasereaktion in Streptokokken und Staphylokokken unterschieden.
Streptokokken wurden mit der Äskulinreaktion auf Zugehörigkeit zur Gruppe D (= Enterokokken) getestet.
Hämolysierende Staphylokokken wurden auf ihr Koagulaseverhalten geprüft.
Grampositive Stäbchen wurden nicht weiter untersucht.

3.2. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.2.1. Material

Für die erste Orientierungsuntersuchung und zum Austesten verschiedener Trennungsmethoden verwendeten wir gepoolten Urin von 10 Mädchen im Alter von 5 bis 11 Jahren ohne urologische Anamnese über mehrere Tage.
Bakterienwachstum wurde mit Natriumazid verhindert; der Urin wurde zweimal täglich ambulant abgeholt, kurz aufgekocht, um Enzymaktivitäten zu zerstören, und 10 Tage gegen Aqua dest. bei 4°C dialysiert (Dialyseschläuche Visking 8/32 von Union Carbide Corp.,Visking Div.,Chicago). Nach der Dialyse wurden die etwa 20 Liter Dialysat auf 1/5 im Rotavapor bei 37° eingeengt und anschließend lyophilisiert. Man erhielt etwa 200 bis 300 mg braunes Pulver pro Kind und Tag.

Für unsere vergleichenden biochemischen Untersuchungen und für den biologischen Attachment-Test verwendeten wir 48 Std.-Urin von 4 gesunden Mädchen und 4 Patientinnen mit besonders häufigen HWI in der Anamnese ohne momentane Infektion. Das Alter dieser Kinder lag ebenfalls bei 5 bis 11 Jahren.
Mit Natriumazid wurde das Wachstum von Kontaminationsbakterien verhindert, der Urin wurde nach 24 und 48 Stunden abgeholt. Um biologische Aktivitäten möglichst wenig zu beeinträchtigen, wurde ohne vorheriges Aufkochen nach 40 Stunden Dialyse bei 4°C gegen Aqua dest. möglichst schnell lyophilisiert.
Die Urinmenge pro Kind lag bei ca. 1100 bis 1800 ml pro 48 Stunden, die Ausbeute bei ca. 1 g Pulver pro Kind.

Bei keinem der Kinder war eine momentane Krankheit oder Medikamenteneinnahme bekannt.

Anmerkung zur Aufarbeitung von Urin:

Bei der Bearbeitung der Urinsubstanzen muß besonders im Hinblick auf biologische Tests möglichst vermieden werden, daß die Proteine ihre Struktur verändern oder biologische Aktivitäten zerstört werden.
Eine lange Aufarbeitungszeit zu Urinpulver und die Anwendung von Wärme (z.B. bei der Einengung im Rotavapor) schädigt verschiedene Proteine durch Enzymaktivitäten oder Wärmeeinwirkung. Kurzes Aufkochen des Urins dürfte Enzymaktivitäten ausschalten, gleichzeitig aber auch eventuelle biologische Aktivitäten zerstören. Die Gefriertrocknung als wahrscheinlich schonendste Methode hat nur eine begrenzte Kapazität. Wiederholtes Gefriertrocknen und Wiederauftauen zerstört ebenfalls einen beträchtlichen Teil von biologischen Aktivitäten und fördert die unerwünschte Aggregation zu Makromolekülen. Auch bei den teils lange laufenden Chromatographien könnten schädigende Enzymaktivitäten eine Rolle spielen.

3.2.2. Methoden

3.2.2.1. Säulenchromatographie

Säulenfüllmaterialien:

Sephadex G 10	
Sephadex G 50 super fine	
Sephadex G 150	
Sephadex G 200	
DEAE - Sepharose	
Sepharose 4 b	
Concanavalin A - Sepharose	Pharmacia Uppsala
CM 23 - Cellulose	Whatman
DEAE - Cellulose	Serva Heidelberg

Die Materialien wurden jeweils nach den Vorschriften des Herstellers vorbereitet.

3.2.2.1.1. Orientierungs- und Bereitstellungschromatographie an Sephadex G 50 super fine

3.2.2.1.1.1. Sephadex G 50 sf zur groben biochemischen Orientierung

Zur groben biochemischen Orientierung wurde gekochter Urin an Sephadex G 50 super fine (sf) chromatographiert.

Gelbett: 2 cm x 67 cm, Totalvolumen: 210 ml
Elutionsmittel: Wasser
Durchfluß: 24 ml/Std., 30 Min.-Fraktionen
Probe: 350 mg Substanz in 5 ml Wasser

Die einzelnen Aliquote des Eluats wurden auf Sialsäure-, Hexose-, Protein- und Elektrolytgehalt untersucht.

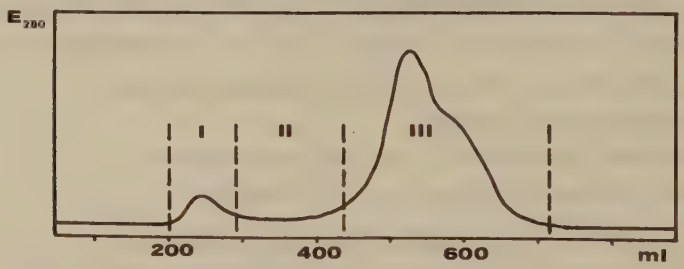
3.2.2.1.1.2. Sephadex G 50 sf zur Materialgewinnung für die vergleichenden Untersuchungen

Zur Materialgewinnung für die vergleichenden Untersuchungen und die biologischen Tests wurden 8 ungekochte, 40 Stunden dialysierte 48 Stunden - Einzel - urine (s. 3.2.1.) in Tris-HCl-Puffer an Sephadex G 50 sf aufgetrennt.

Gelbett: 3 cm x 75 cm, Totalvolumen: 530 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4
Durchfluß: 44 ml/Std., 30 Min.-Fraktionen
(keine bessere Auftrennung bei geringerem Durchfluß)
Probe: max. 700 mg Substanz in 10 ml Puffer
(die Chromatographien wurden bis zur Trennung des gesamten Materials meist zweimal pro Kind durchgeführt)

Aus den verschiedenen Fraktionen wurden 3 Pools gebildet, die in Abb. 1 mit römischen Zahlen bezeichnet sind. Diese Pools werden im weiteren G 50/1, G 50/2 bzw. G 50/3 genannt.

Abb.1: Bereitstellungschromatographie von dialysierten Einzelurinen an Sephadex G 50 sf



Vor der weiteren Verarbeitung wurden G 50/1 und G 50/2 an Sephadex G 10 in Wasser entsalzt (s. 3.2.2.1.3.).

Anmerkung: Das im Vergleich zum Orientierungslauf (Abb.9) veränderte Verhältnis vorderer - hinterer Peak erklärt sich aus der verkürzten Dialysezeit.

3.2.2.1.2. Chromatographie der hochmolekularen G 50 sf - Fraktion (G 50/1)

3.2.2.1.2.1. Gelchromatographie an Sephadex G 150 und G 200

Die erste weitere Auftrennung der hochmolekularen Urinbestandteile (G 50/1) wurde an Sephadex G 150 und G 200 versucht.

Sephadex G 150:
Gelbett: 1 cm x 120 cm, Totalvolumen: 94 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4
Durchfluß: 4 ml/Std., 30 Min.-Fraktionen
Probe: 10 mg G 50/1 - Lyophilisat in 3,5 ml Puffer

Die Chromatographien an Sephadex G 200 wurden unter analogen Bedingungen durchgeführt.

3.2.2.1.2.2. Ionenaustauschchromatographie an CM 23 - Cellulose

Die Säule wurde mit einem Pyridin-Acetat-Puffer, 2,5 M, pH 4,0 äquilibriert und mit einem linearen Gradienten von pH 4,0 bis 6,0 eluiert.
Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit dem Technicon-Autoanalyzer bestimmt.

Gelbett: 1 cm x 33 cm, Totalvolumen: 26 ml
Elutionsmittel: Pyridin-Acetat-Puffer, 2,5 M, pH 4
bzw. pH 6
Durchfluß: 32 ml/Std., 10 Min.-Fraktionen
Probe: 24 mg G 50/1-Lyophilisat in 5 ml Puffer
(pH 4 kontrolliert)

Der Gradient (2 x 250 ml) wurde nach 70 Minuten (ab Fraktion 8) angeschlossen.

3.2.2.1.2.3. Chromatographie an Sepharose 4 b

Ein weiterer Trennungsversuch wurde an Sepharose 4 b unternommen:

Gelbett: 2 cm x 75 cm, Totalvolumen: 236 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4
Durchfluß: 27 ml/Std., 20 Min.-Fraktionen
Probe: 50 mg G 50/1-Lyophilisat in 4 ml Puffer

3.2.2.1.2.4. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose

Gelbett: 1 cm x 21 cm, Totalvolumen: 16 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 9 bzw. 6
Durchfluß: 25 ml/Std., 12 Min.-Fraktionen
Probe: 20 mg G 50/1-Lyophilisat in 4 ml Puffer (pH 9)

Der Gradient (2 x 250 ml wurde mit Fraktion 5 (nach 48 Min.) angeschlossen.

3.2.2.1.2.5. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose

Der Trennungsversuch wurde bei 3 verschiedenen Molaritätsgradienten unternommen.

Gelbett: 1 cm x 25 cm, Totalvolumen: 20 ml
Elutionsmittel: Phosphatbasispuffer, 0,01 M, pH 7,4
mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen
Durchfluß: 40 ml/Std.
Probe: je 20 mg G 50/1-Lyophilisat in 5 ml Puffer

Für die Gradienten wurden offene 250 ml - Bechergläser desselben Typs verwendet.

Erster Versuch: NaCl-Gradient von 0,005 - 0,3 M, nachgewaschen mit 2 M
Zweiter Versuch: NaCl-Gradient von 0,5 - 2 M.
Dritter Versuch: NaCl-Gradient von 0 - 1 M.

3.2.2.1.2.6. Affinitätschromatographie an Concanavalin A - konjugierter Sepharose

Die Chromatographien wurden unter Wasserkühlung durchgeführt (etwa 10°C).

Gelbett: 1 cm x 15 cm, Totalvolumen: 12 ml

Elutionsmittel: 0,1 M Na-Acetat, pH 6,5
0,1 M NaCl
0,001 M $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$

zum Eluieren der adsorbierten Substanzen

zusätzlich 0,1 M α-D-Methylmannosid

Durchfluß: 60 ml/Std., 15 Min.-Fraktionen

Probe: 30 mg G 50/1-Lyophilisat in 5 ml Puffer

Bei der für alle Chromatographien, die nicht in Wasser laufen, obligaten Entsalzung (z.B. an Sephadex G 10, s. 3.2.2.1.3.) wird auch das α-D-Methylmannosid mitentfernt.

3.2.2.1.2.7. Sepharose 4 b - Chromatographie von den beiden Con A - Peaks

Gelbett: 1 cm x 80 cm, Totalvolumen: 63 cm

Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4

Durchfluß: 12 ml/Std., 20 Min.-Fraktionen

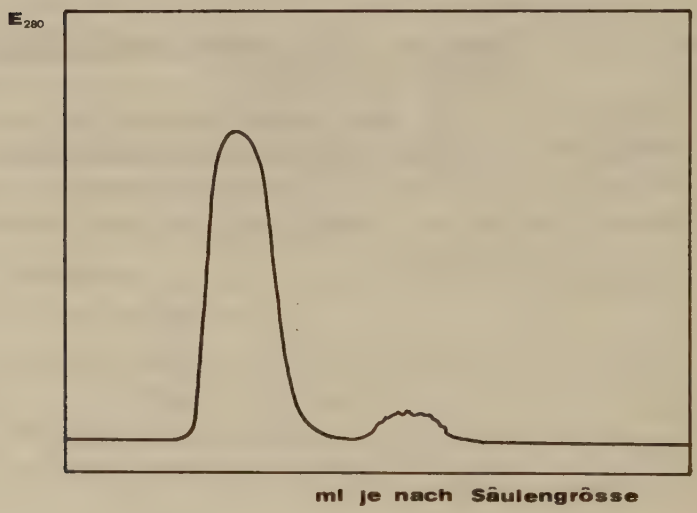
Probe: 4 mg Con A - Lyophilisat (s. 3.2.2.1.2.6.) in 1 ml Puffer

3.2.2.1.3. Entsalzung an Sephadex G 10

Sämtliche Pools aller nicht in Wasser durchgeführten Chromatographien, d.h. sämtliche Chromatographien mit Ausnahme des ersten G 50 sf - Orientierungslaufes, wurden über Sephadex G 10 entsalzt.

Die Säulendimensionen bei den verschiedenen Entsalzungen wurden je nach Auftragsvolumen gewählt (Auftragsvolumen maximal 10 % des Säulenvolumens), Laufmittel war Wasser. Der Durchfluß wurde entsprechend des Säulenvolumens bzw. Gelbettes gewählt (z.B. bei einer 900 ml - Säule bis zu 350 ml pro Stunde).

Abb.2: Prinzipieller Kurvenverlauf einer Entsalzung:



3.2.2.2. Bestimmung der Sialsäure

3.2.2.2.1. Quantitative Sialsäurebestimmung mit Thiobarbitursäure nach Aminoff (3)

Reagenzien: a) Perjodat: 25 mM Perjodsäure in 0,125 n H_2SO_4 (pH 1,2)

b) Arsenit: 2 % Na-Arsenit in 0,5 n HCl

c) Thiobarbitursäure: 0,1 M 2-Thiobarbitursäure in Wasser, pH mit 5 n NaOH auf 9 einstellen (aufzubewahren in dunkler Flasche bei 4°C 1 Monat)

d) Butanol-Säure: Butanol-1 + 5 % 12 n HCl

Durchführung:

Die Probe wird in Schliffreagenzgläsern mit 0,5 ml 0,125 n H_2SO_4 versetzt und eine Stunde bei 80°C hydrolisiert. Nach Zugabe von 0,25 ml Perjodat (= a) findet bei 37°C im Wasserbad die Oxidation statt (30 Min.). 0,2 ml Na-Arsenit (= b) bewirkt innerhalb von 1-2 Min. Verschwinden der gelben Farbe des freigesetzten Jods. Durch 10-minütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad mit 2,0 ml Thiobarbitursäure (= c) färbt sich die Probe an. Nach Kühlung in Eiswasser wird zur Stabilisierung der Färbung 5,0 ml Butanol-Säure (= d) zugegeben, kräftig geschüttelt und kurz, schnell zentrifugiert.

Die angefärbte Butanolphase wird bei 549 nm im Photometer gegen einen mitgeführten Leerwert gemessen.

Mit definierten Sialsäureeinwaagen im Bereich von 2 - 50 µg wurde eine Eichkurve erstellt, an der der Sialsäuregehalt der Proben in µg abgelesen werden konnte.

3.2.2.2.2. Qualitative Sialsäurebestimmung mit Resorcinol nach Svennerholm (81)

Reagenzien: Lösung 1: 2,0 g Resorcinol ad 100,0 ml H_2O
haltbar in der Tiefkühltruhe

Lösung 2: 10 ml Lösung 1
+ 80 ml konz. HCl
+ 0,25 ml 0,1 M $CuSO_4$-Lsg.
+ 9,75 ml H_2O (ergibt 100 ml Lsg.2)
stabil 14 Tage in der Tiefkühltruh

Durchführung:

0,5 bis 2 ml Probe (je nach Sialsäuregehalt) wird mit 2,0 ml Lösung 2 versetzt, 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und abgekühlt. Nach Zugabe von 5,0 ml Isoamylalkohol wird geschüttelt, 15 Min. im Eisbad gekühlt, zentrifugiert und nochmals gekühlt.

Die angefärbte organische Phase wird bei 480 nm im Photometer gegen einen mitgeführten Leerwert gemessen.

Anmerkung: Die Sialsäurebestimmung nach der Resorcinolmethode ist etwas einfacher durchzuführen als die vorher beschriebene Methode; sie ist jedoch unempfindlicher und wurde deshalb nur zur qualitativen Kontrolle der Chromatographien verwendet. Eine Eichkurve wurde daher nicht erstellt.

3.2.2.3. Zuckerbestimmung

3.2.2.3.1. Gesamtzuckerbestimmung mit Orcin nach Winzler (90)

Reagenz: 4 Teile einer 70 % H_2SO_4 und 1 Teil einer 1,6 % wäßrigen Orcinlösung (2 Tage haltbar) werden unter Eiskühlung gemischt.

Durchführung:

Etwa 0,5 ml Probe (meist Eluat der Chromatographien, Menge je nach Zuckergehalt) werden mit 2 ml Orcinreagenz versetzt. Unter häufigem Schütteln wird 15 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Nach 35 Minuten Stehen bei Raumtemperatur wird bei 540 nm im Photometer gegen einen mitgeführten Leerwert gemessen.

Da wir diese Methode nur zum qualitativen Zuckernachweis und zur Bestimmung von Zuckerverteilungen benützten, war eine Eichung mit mitgeführten Standards nicht nötig.

3.2.2.3.2. GLC (Gas Liquid Chrom.) von Hexosen und Hexosaminen nach Porter (58)

Gerät: Gaschromatograph Hewlett - Packard 7420 A

Säulenfüllung: 0.75 % HiEFF-1BP, 0,25 % EGSS-X 0,1 PDEA 60/80 mesh Gaschrom Q

Säulenlänge: 2 m

Initial temp.	150°C
Endtemp.	190°C
Programm	1.0°C/min
Block	230°C
Flammenionisationsdetector	280°C
Trägergas	N_2 20 ml/min

Reagenzien: Dowex 50 W x 2 (H^+), 200 - 400 mesh p.a. (Serva, Heidelberg)
Dowex 1 x 8 (HCO_3), 200 - 400 mesh p.a. aus der Cl-Form mit 0,5 N $NaHCO_3$ (Serva, Heidelberg)
Pyridin p.a. und Acetanhydrid p.a. (Merck, Darmstadt) wurden frisch destilliert

Durchführung:

Die Proben (G 50/1, 2 mg) werden in Analysenröhrchen in 50 µl Wasser gelöst und mit 50 µl 40 % w/v Dowex 50 W x 2 in 0,02 n Salzsäure versetzt, unter Vakuum eingeschmolzen und 48 h bei 100°C hydrolisiert. Nach dem Abkühlen wird die Probe mit 0,1 - 0,15 µM m-Inosit als internem Standard versetzt.
Deaminierung: 30 Min. nach Zugabe von 10 µl frisch hergestelltem 5,5 M Natriumnitrit und nach zwischenzeitlichem Mischen wird 100 µl 40 % (w/v) Dowex W 50 x 2 in Wasser dazugegeben und gemischt. Dabei entsteht aus Natriumnitrit salpetrige Säure, die zur Deaminierung der Hexosamine zu Hexosen führt. Die Stickstoffentwicklung dauert etwa 30 Minuten.

Zur chromatographischen Reinigung der Zucker werden zwei Pasteur-Pipettensäulen vorbereitet:

S 1: 200 1 40 % Dowex W 50 x 2 in H_2O

S 2: 500 1 20 % Dowex 1 x 8 in H_2O

Die Probe wird von S 1 in S 2 laufen gelassen und mit 3 x 200 µl Wasser nachgewaschen, das verworfen wird. Die beiden Säulen werden mit 800 µl Methanol 50 % nachgewaschen. Die kombinierten Eluate werden in kleinen Röhrchen gesammelt und im Vakuum eingedampft.

Um die Zucker auf dem Gaschromatographen chromatographierbar zu machen, werden sie reduziert und acetyliert. Dazu wird die Probe in 50 µl Wasser gelöst und mit 50 µl 0,22 M Natriumborhydridlösung versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wird das überschüssige $NaBH_4$ mit 20 µl Eisessig zerstört und zur Entfernung der Borsäure 4 mal mit 100 µl Methanol-HCl 1000:1 nachgedampft.

Zur Acetylierung wird die trockene Probe in 50 µl Pyridin als Lösungsmittel und Reaktionsbeschleuniger gelöst und mit 50 µl Acetanhydrid versetzt, in Ampullen eingeschmolzen und 30 Min. bei 100°C belassen.

Zur Bestimmung werden 1 - 5 µl ≙ 3 nmol Zucker in den Gaschromatographen injiziert.

Die Zucker werden mit Hilfe der Retentionszeiten anhand von Standards identifiziert.

Als interner Standard diente m-Inosit.

3.2.2.4. SDS - Gelelektrophoresen nach Furthmayr und Timpl (33)

Die vergleichenden Elektrophoresen der hochmolekularen G 50 sf - Fraktionen (G 50/1) und der durch Con A - Chromatographie gewonnenen beiden Teilbereiche von G 50/1 wurden nach der von Furthmayr und Timpl (33) beschriebenen Methode an einem Diskelektrophorese-Gerät der firma LKB in Glaszylindern von 0,6 x 10 cm Größe durchgeführt.

Die Bedingungen wurden so gewählt, daß hauptsächlich die hochmolekularen Uringlykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 50 000 bis 200 000 zur Darstellung kamen.
Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Auftragspuffer (0,01 M Na-Phosphat, 5 M Harnstoff, 0,2 % SDS, pH 7,0) gelöst. Der Kammerpuffer enthielt 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0 und 0,2 % SDS. Es wurden 5 % Gele (Acrylamid, Methylen-Bisacrylamid und SDS, Serva) verwendet. Pro Gel wurden 80 µg Protein aufgetragen und mit 6 mA/Gel einer 12-stündigen Elektrophorese unterworfen.
Anschließend wurden die Gele mit einer Lösung von 0,25 % Coomassie Birllant Blue (Serva, Heidelberg) in 20 % Trichloressigsäure 2 Stunden auf Protein angefärbt.
Entfärbt wurde in 7 % Essigsäure.

3.2.2.5. Aminosäureanalysen nach Spackman et.al. (63)

Reagenzien: Salzsäure rauchend (min. 37 %)
tri-Natriumcitrat-2-hydrat
Pyridin p.a.
Methansulfonsäure puriss.
3-(3-Indolyl)propionsäure puriss.

Gerät: Aminosäureanalysator LC 4010, Biotronik, München
Säule mit Harz Durrum, Type DC-1A
Puffer: Durrum, Pico Puffer, System III, Durrum Chemical Corp., Palo Alto, Calif.
Rechner: rwt System 100

Durchführung:

Zu den ca. 0,5 mg Protein enthaltenden Proben wurden 0,2 ml 5,7 M Salzsäure gegeben und die Röhrchen unter Vakuum zugeschmolzen. Anschließend Inkubation in einem Heizblock bei 110°C für 24 Stunden. Danach wurden die Röhrchen geöffnet, die Salzsäure unter Vakuum abgedampft, der Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen und nochmals abgedampft.
Die Probe wurde in 0,5 ml 0,2 M Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufgenommen und auf den Aminosäureanalysator aufgegeben.

3.2.2.6. N - terminale Aminosäuresequenzanalyse

3.2.2.6.1. Manuelle Sequenzanalyse nach Petersen et.al. (57)

Reagenzien: Phenylisothiocyanat puriss.(PTC), Fluka AG, Buchs, Schweiz

Benzol p.a., Merck, Darmstadt

Äther zur Narkose, Höchst AG, Frankfurt

Kupplungspuffer:
1,185 ml Dimethylallylamin, Pierce Chem. Corp., Rockford, Illinois
+ 15 ml 1-Propanol p.a., Merck, Darmstadt
+ 30 ml dest. Wasser
pH auf 9,5 mit Trifluoressigsäure p.A., Merck, Darmstadt

Durchführung:

Kupplung:

1 - 5 mg Peptid bzw. Protein werden in 100 µl Kupplungspuffer gelöst. 5 µl Phenylisothiocyanat (PTC) werden unter Stickstoff zugegeben und das Reaktionsgemisch für 20 Min. in ein Wasserbad von 50°C gestellt. Danach wird mit 0,5 ml Benzol extrahiert und die Benzolphase jeweils nach Zentrifugation mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die wässrige Phase (der Rückstand) wird zuerst bei 50°C unter Stickstoff, dann 60 Minuten bei 50°C an der Ölpumpe getrocknet.

Spaltung:

Zu dem nun trockenen PTC-Peptid wird 100 µl konzentriert Trifluoressigsäure hinzugefügt und die Probe 7 Minuten bei 50°C im Wasserbad stehengelassen. Danach wird die Trifluoressigsäure mit Stickstoff verdampft und dabei der Rest als Film gleichmäßig an der Glaswand verteilt. Das Aminosäurethiazolinon wird mit 1 ml Äther extrahiert.

Konvertierung:

Die Ätherphase wird unter Stickstoff zur Trockene eingedampft, mit 0,2 ml 1 M Salzsäure versetzt und der größte Teil der Luft durch Stickstoff verdrängt. Das Reaktionsgemisch wird für 10 Minuten in einem Ölbad auf 80°C gehalten. Die wässrige Phase wird mit einigen ml Essigsäureäthylester extrahiert. Dabei gehen alle PTH-Aminosäuren bis auf PTH-Arginin, PTH-Histidin und PTH-Cysteinsäure in die organische Phase. Der Essigsäureäthylester wird nun mit Stickstoff zur Trockene eingedampft und in 50 µl 1,2-Dichloräthan aufgenommen.

Für das Eindampfen unter Stickstoff und die Extraktion wurden Manifolds benutzt, die es erlaubten, bis zu 10 Proben gleichzeitig zu behandeln.

3.2.2.6.2. Automatische Sequenzanalyse nach Edman und Begg (25)

Die automatische Sequenzanalyse wurde in einem von Edman gebauten Sequenator durchgeführt.

Im Sequenator laufen die Kupplungs- und Spaltungsreaktionen ab, der Konvertierungsvorgang wird außerhalb des Gerätes analog 3.2.2.6.1. durchgeführt.

3.2.2.6.3. Identifizierung der PTH-Aminosäuren nach Edman (24)

Die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie durch Vergleich mit einer Referenzlösung.

Gerät: Hewlett-Packard

3.3. BIOLOGISCHER IN-VITRO-ATTACHMENT-TEST

3.3.1. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde der Einfluß bestimmter Urinsubstanzen auf das Attachmentverhalten eines E.coli-Stammes an Harnwegsepithelzellen.

Als Testbakterienstamm wurde ein vorher getesteter, an Harnwegsepithelien besonders gut adhärierender E.coli-Stamm gewählt. Bei allen Tests wurde dieser Stamm benützt.
Als Testepithelien wurden für sämtliche Untersuchungen Zellen aus dem frischgelassenen Spontanurin einer 20-jährigen weiblichen, urologisch gesunden Laborangestellten benutzt. An Menstruationstagen wurde nicht gesammelt. Auf die genaue Zyklusphase wurde bei der Gewinnung der Testepithelien nicht geachtet, da nach Svanborg Edén et.al. (76) durch die täglichen Schwankungen sich die Attachmentzahlen nur in der Größenordnung von 3 % ändern.
Getestet wurde der Einfluß auf das Attachmentverhalten von

G 50/1, G 50/2, Con A/1 und Con A/2

vergleichend zwischen den Substanzen von 4 gesunden und 4 harnwegsinfektdisponierten Mädchen im schubfreien Intervall im Alter von 5 bis 11 Jahren.
Die Urinsubstanzen wurden meist in gegenüber den physiologischen Verhältnissen stark erhöhten Konzentrationen zugegeben.
Bei einer Tagesurinmenge von ca. 600 - 800 ml pro Kind und einer Ausbeute von ca. 500 mg Lyophilisat pro Kind und Tag aus dem 40-stündigen Dialysat, sowie einem Gewichtsanteil von 6 - 9 % der Auftragsmenge für die Chromatographie für G 50/1, würde eine Konzentration von etwa 0,05 mg/ml für die Substanzen von G 50/1

etwa den physiologischen Verhältnissen entsprechen. Da G 50/2 quantitativ einem größeren Anteil der Auftragsmenge entspricht, müßte man, um physiologische Konzentrationen zu erreichen, etwa 0,07 mg/ml als Testkonzentration wählen.
Für Con A/1 und Con A/2 läge die physiologische Konzentration bei etwa 0,02 - 0,03 mg/ml.

Wir wählten für unsere Bestimmungen Konzentrationen von 0,05, 0,5 und 2,0 mg/ml.

3.3.2. Methode, modifiziert nach Svanborg Edén (75), Svanborg Edén et.al.(76,78)

Material: Phosphatpuffer, 0,01 M, pH 7,1
Trypanblau
Brainheart infusion

Durchführung:

Zur Gewinnung von Harntraktsepithelzellen wird frischer Urin einer gesunden Spenderin 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wird einmal in Phosphatpuffer gewaschen; wenn die Suspension noch einen gelblichen Farbton aufweist, wird die Waschung wiederholt.
Die Bakterien erhält man aus der Übernachtkultur eines gut klebenden E.coli-Stammes: ca. 16 Stunden wird eine E.coli-Kultur in 3 ml Brainheart-Infusion (oder einem anderen glucosefreien Medium bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die sedimentierten Bakterien in 3 ml Phosphatpuffer resuspendiert.
Anschließend wird die Konzentration der Bakterien und Epithelien in der Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und durch entsprechende Verdünnung eine

Konzentration von 10^8 Bakterien pro ml bzw. 10^5 Epithelien pro ml hergestellt.

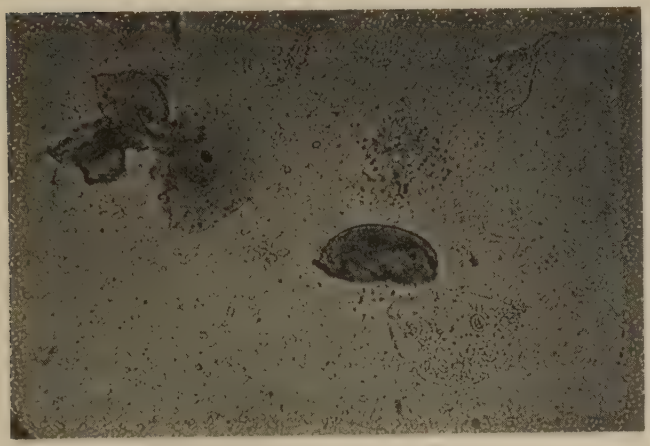
Zu 0,1 ml der Bakteriensuspension, 0,1 ml der Zellsuspension und 0,3 ml Phosphatpuffer wird nun die zu testende Substanz gegeben und 1 Std. bei 37°C geschüttelt. Die Substanzmengen wählten wir für unsere Tests in Konzentrationen von 0,05, 0,5 und 2,0 mg/ml.
Anschließend wird 4 mal mit 3 ml Phosphatpuffer gewaschen, damit die nicht adhärierenden Bakterien entfernt werden; bei öfterem Waschen würden sich zu viele Bakterien wieder lösen (Mitteilung aus dem Labor von Svanborg Edén).
Durch Zugabe von Glutardialdehyd wird die Suspension konserviert und weiteres Attachment verhindert. Tote Zellen werden durch Zugabe von Pasteur-Trypan-Blau (1/2 Tropfen) blau angefärbt und nicht gezählt.

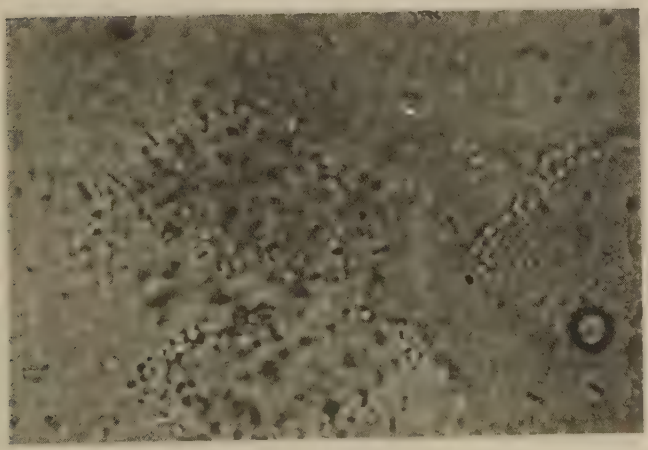
Schließlich wird unter dem Lichtmikroskop bei 40 Zellen die Bakterienzahl bestimmt und der Mittelwert gebildet.

Bei unseren Tests bestimmten wir ohne Zugabe von Urinsubstanz den Standard, setzten ihn gleich 100 % und bezogen darauf die Testwerte.

Abb. 3 und 4 zeigen mit Bakterien beladene Epithelzellen.

Abb. 3,4: Mit Bakterien beladene Epithelzellen





4. Ergebnisse

4.1. Orientierungsuntersuchung:

BESTIMMUNG DER PERIURETHRALFLORA

4.1.1. Mittelstrahlurine

Die Mittelstrahlurine der 20 gesunden Probanden zeigten in geringer Keimzahl die übliche Kontaminationsflora wie Staphylokokken, Streptokokken und grampositive Stäbchen. Nur in einem Fall fanden wir einige E.coli.

Patientinnen der Harnwegssprechstunde wurden als schubfrei klassifiziert, wenn ihr Mittelstrahlurin weniger als 1000 gramnegative Enterobakterien oder Enterokokken pro ml aufwies. Mit Ausnahme von 3 Fällen war auch in dieser Gruppe von 36 Kindern der Urin darmbakterienfrei.

Zwei weitere Kinder mit Keimzahlen zwischen 1000 und 100 000/ml wurden ebenso wie ein Kind mit 100 000/ml grampositiven Stäbchen wegen der unklaren Interpretation nicht in die Statistik aufgenommen.

Von den 30 als Patienten mit akutem Schub klassifizierten Kindern hatten alle über 100 000 Darmbakterien pro ml Urin, davon

25 mal E.coli
1 mal Proteus mirabilis
2 mal Pseudomonas aeruginosa
2 mal Klebsiellen.

Wegen der Schwierigkeit des statistischen Vergleichs wurden 4 weitere Kinder mit Enterokokkeninfektionen ebenfalls nicht berücksichtigt.

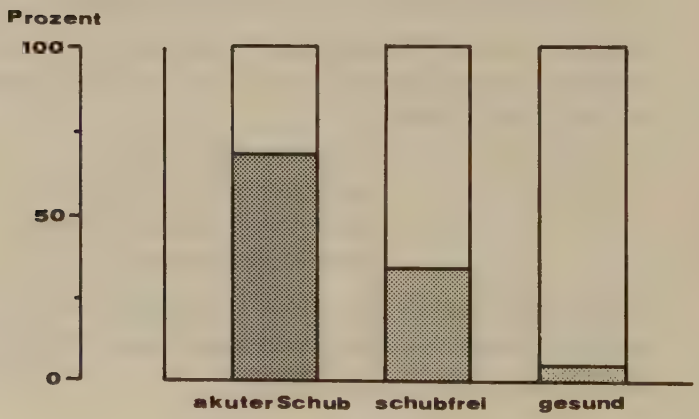
4.1.2. Periurethralflora

Beim Vergleich der mit unserer Stempelmethode und den entsprechenden bakteriologischen Bestimmungen festgestellten Periurethralbesiedelung (im experimentellen Teil beschrieben) zeigte sich der deutlichste Unterschied zwischen den drei Gruppen gesund - schubfreies Intervall - akuter Schub in der Prävalenz der Enterokokken als Begleitflora, d.h. im Auftreten der Enterokokken an der Periurethralregion, ohne selbst infizierende Spezies zu sein.

Während wir in der gesunden Gruppe nur bei einem von 20 Mädchen Enterokokken fanden, wiesen 1/3 der Patientinnen im schubfreien Intervall und 2/3 der Mädchen mit akuter Infektion Enterokokken auf.

Abb.5 zeigt die quantitativen Verhältnisse, in Tab.1 sind die Fallzahlen dargestellt.

Abb.5: Prävalenz der periurethralen Enterokokken in den 3 Gruppen akuter Schub - schubfrei - gesund



Tab. 1: Prävalenz der Enterokokken im Periurethralabstrich

akuter Schub	E. in 20 v. 30 Fällen	≙ 2/3
schubfrei	E. in 12 v. 36 Fällen	≙ 1/3
gesund	E. in 1 v. 20 Fällen	≙ 1/20

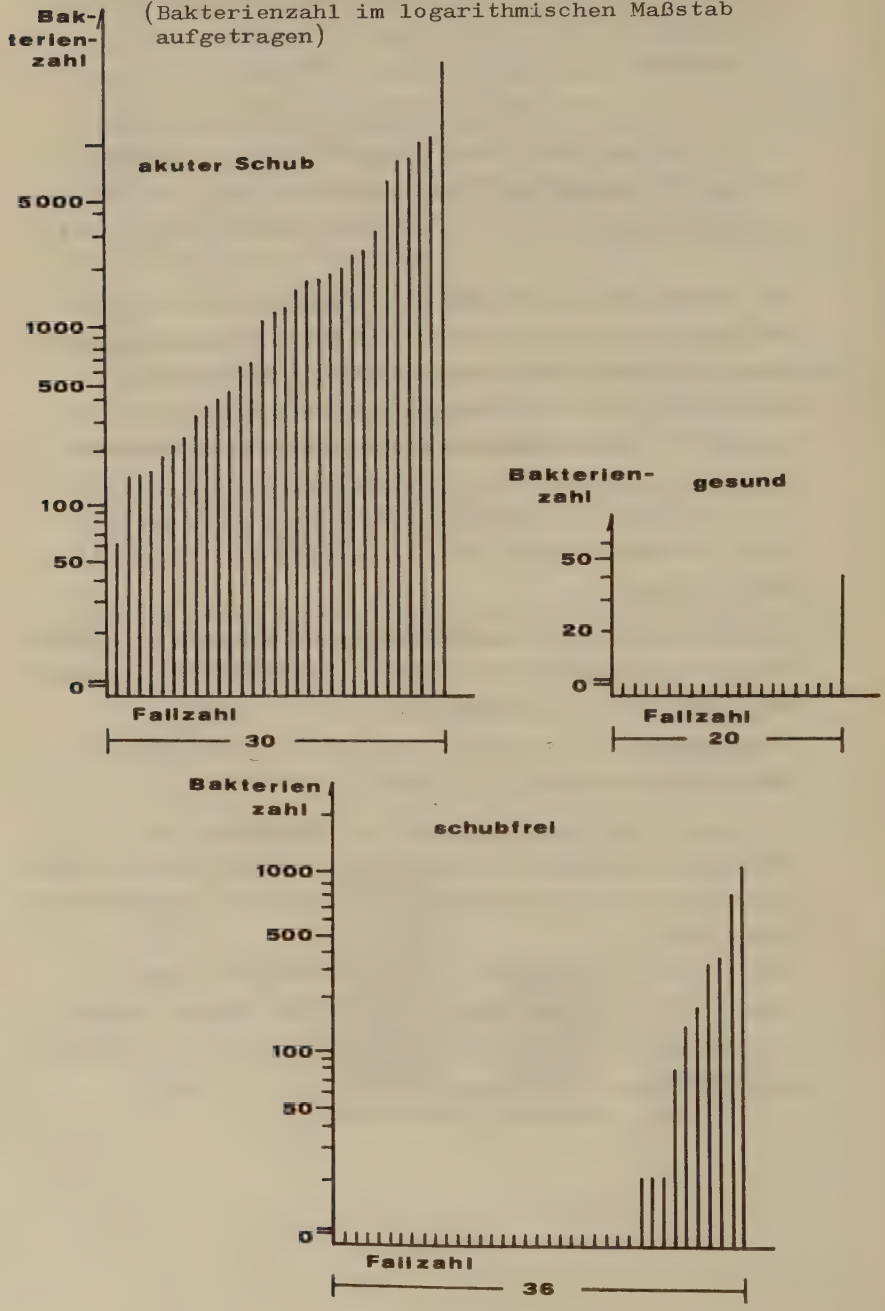
Bei Hinzunahme der 4 Mädchen mit Enterokokkeninfektionen zur Gruppe der akut Erkrankten läge die Enterokokkenhäufigkeit bei 24 von 34 Fällen (≙ knapp 3/4).

Die Prävalenz gramnegativer Darmbakterien im Periurethralabstrich lag bei den Mädchen im akuten Schub erwartungsgemäß auch wegen der Kontamination mit Urinkeimen bei 100 %. In der schubfreien Gruppe wiesen 10 von 36 Kindern gramnegative Darmbakterien auf. In der gesunden Kontrollgruppe fanden wir bei 1 von 20 Mädchen E.coli in geringer Zahl. Dieses Kind ist nicht identisch mit dem gesunden Kind mit Enterokokken.

Waren gramnegative Darmbakterien vorhanden, so lag die durchschnittliche Zahl in der schubfreien Gruppe bei 288, während das gesunde Kind nur 2 Kolonien entsprechend 40 Bakterien periurethral auf unseren Agarplatten aufwies (s. Punkt 3.1.3.).

Die Anzahl der gramnegativen Darmbakterien pro Abstrichstempelquerschnitt ist für jedes Kind in Abb.6 dargestellt, die Prävalenz gramnegativer Darmbakterien zeigt Tab. 2.
Abb. 7 zeigt die Anzahl der gramnegativen Spezies, soweit ihre Kolonieform unterschieden werden konnte, vergleichend in den 3 Gruppen akuter Schub - schubfrei - gesund.

Abb.6: Anzahl der gramnegativen Darmbakterien pro Abstrichstempelquerschnitt, für jedes Kind einzeln dargestellt (Bakterienzahl im logarithmischen Maßstab aufgetragen)

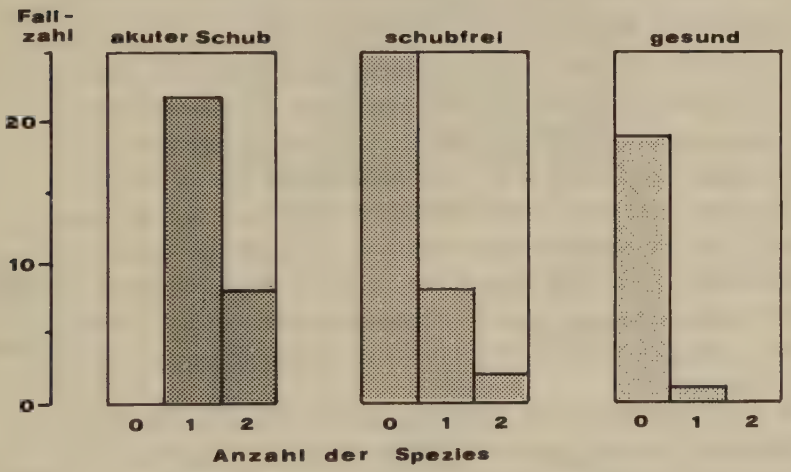


Der Urin der beiden Mädchen im schubfreien Intervall mit der stärksten gramnegativen Besiedelung (740 bzw. 1080 E.coli) zeigte bei einer Überprüfung nach zwei Wochen keine Infektion.

Tab.2: Prävalenz gramnegativer Darmbakterien

akuter Schub	Darmbakt. in 30 v. 30 F. ≙ 100 %
schubfrei	Darmbakt. in 10 v. 36 F. ≙ knapp 1/3
gesund	Darmbakt. in 1 v. 20 F. ≙ 1/20

Abb.7: Anzahl der gramnegativen Spezies, soweit ihre Kolonieformen unterschieden werden konnten



Die Besiedelung setzte sich folgendermaßen zusammen (verschiedene E,coli-Stämme nur soweit unterschieden, als sie verschiedene Koloniemorphologie zeigten):

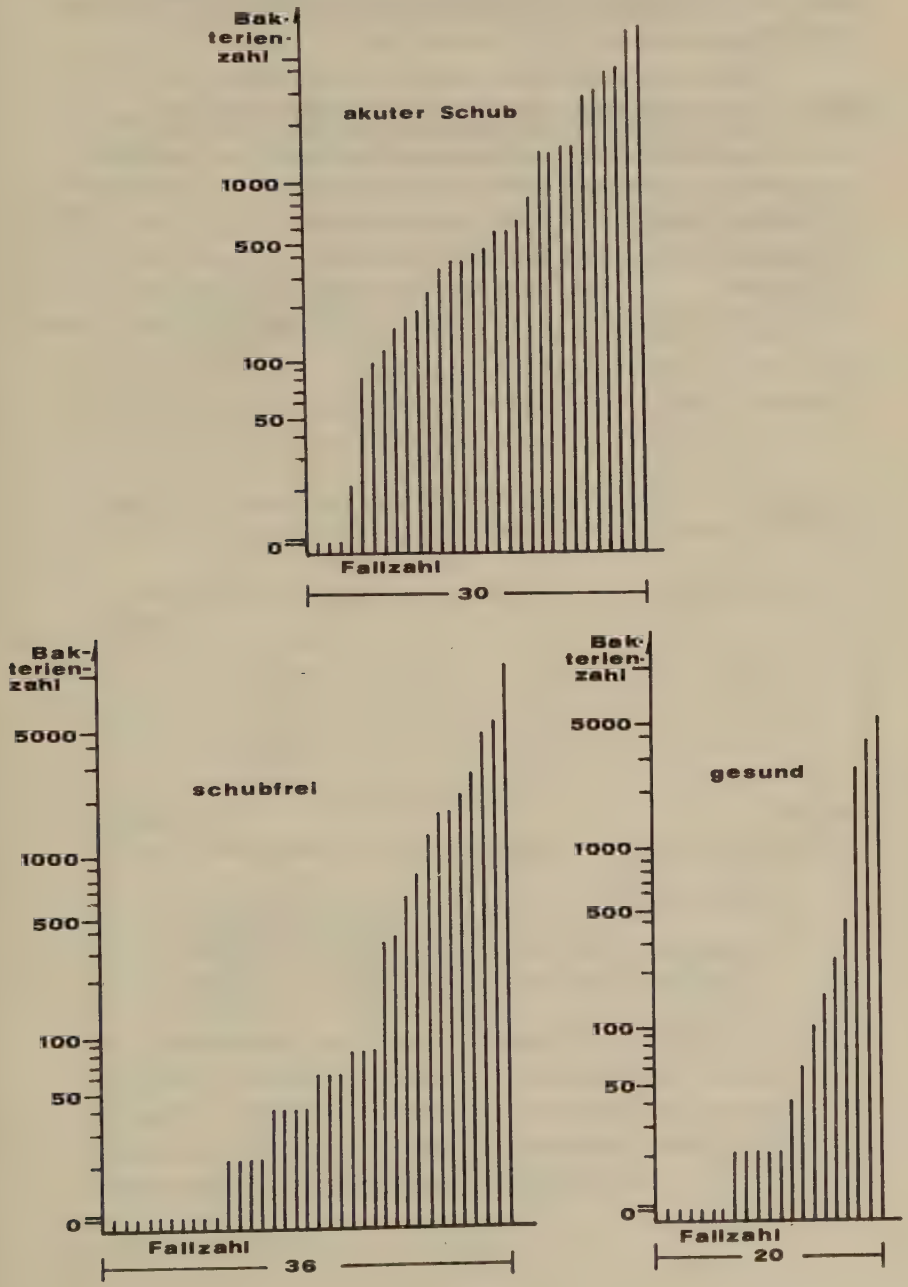
akuter Schub:	20 mal	E.coli, 1 Stamm
	3 mal	E.coli, 2 Stämme
	2 mal	Proteus + E.coli
	1 mal	Klebsiellen + E.coli
	1 mal	Enterobacter aerogenes + E.coli
	1 mal	Klebsiellen + Enterobact.cloacae
	2 mal	Pseudomonas aeruginosa
schubfrei:	8 mal	E.coli, 1 Stamm
	1 mal	E.coli, 2 Stämme
	1 mal	Citrobacter freundii + E.coli
gesund:	1 mal	E.coli, 1 Stamm

Außer den uropathogenen Keimen bestimmten wir auch - unter dem Gesichtspunkt einer möglichen unspezifischen Abwehrschwäche - die grampositive Begleitflora.

Grampositive Stäbchen kamen in allen Gruppen in Zahlen bis über 10 000 pro Stempelquerschnitt vor; sie wurden nicht weiter untersucht. Der nach den grampositiven Stäbchen häufigste Begleitkeim war Staphylokokkus epidermidis, der in über der Hälfte der Fälle aller 3 Gruppen auftrat. Staph.aureus fanden wir bei keinem Kind. Die nächsthäufigsten Keime waren Enterokokken (Prävalenz 2/3, 1/3 bzw. 1/20, s.o.), in geringerer Zahl alpha-hämolysierende Streptokokken und in insgesamt 4 Fällen beta-hämolysierende Streptokokken.

Bei der quantitativen Betrachtung sämtlicher Begleitbakterien einschließlich gramnegativer Begleitflora, aber ohne grampositive Stäbchen fiel die deutlich höhere Besiedelungsdichte bei Infektion gegenüber der schubfreien und gesunden Gruppe auf.
Diese quantitativen Verhältnisse sind für jedes Kind einzeln in Abb.8 dargestellt (ohne infizierende Spezies und ohne grampositive Stäbchen).

Abb.8: Anzahl der Begleitbakterien pro Abstrichstempelquerschnitt ohne grampositive Stäbchen in den drei Gruppen akuter Schub - schubfrei - gesund, dargestellt für jedes Kind einzeln (Bakterienzahl im logarithmischen Maßstab)



Wählt man eine willkürliche Grenze bei 100 Bakterien, so zeigen nur etwa je 1/3 der schubfreien und gesunden Kinder, jedoch über 3/4 der Kinder im akuten Schub mehr als 100 Begleitbakterien periurethral. Die genauen Fallzahlen sind in Tab.3 angegeben.

Tab.3: Quantitativer Vergleich der Begleitbakterien ohne grampositive Stäbchen in den 3 Gruppen akuter Schub - schubfrei - gesund

akuter Schub	über 100 Begleitbakt. 23 v. 30 F.	3/4
schubfrei	über 100 Begleitbakt. 12 v. 36 F.	= 1/3
gesund	über 100 Begleitbakt. 6 v. 20 F.	1/3

4.2. EIGENE NEUE UNTERSUCHUNGEN

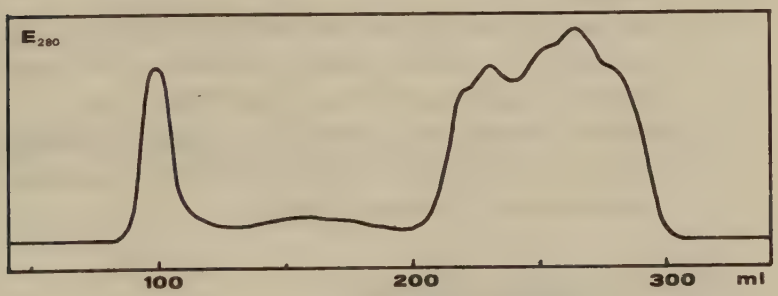
4.2.1. UNTERSUCHUNG DER HÖHERMOLEKULAREN URINBESTANDTEILE

4.2.1.1. Grobe biochemische Charakterisierung

4.2.1.1.1. Sephadex G 50 sf - Gelchromatographie

Zur ersten Orientierung über die biochemische Zusammensetzung der nicht dialysierbaren Urinbestandteile führten wir eine Auftrennung von gepooltem gekochtem, 10 Tage gegen Wasser dialysiertem, lyophilisiertem und filtriertem Urin mit Gelchromatographie an Sephadex G 50 sf in Wasser durch.
Wir erhielten bei einer Extinktion von 280 nm einen proteinreichen Frontpeak, ein proteinärmeres Zwischenstück und einen zweiten Peak mit bräunlicher Färbung. Der Extinktionsverlauf ist in Abb.9 dargestellt.

Abb.9: Extinktionsverlauf bei 280 nm einer Sephadex G 50 sf - Chromatographie von 10 Tage dialysiertem Urin



Gelbett: 2 cm x 67 cm, Totalvolumen: 210 ml
Elutionsmittel: Wasser
Durchfluß: 24 ml/Std., 30 Min.-Fraktionen
Probe: 350 mg Urinsubstanz in 5 ml H_2O

Im experimentellen Teil wurden unter Punkt 3.2.2.1.1.2. die drei Bereiche 1.Peak, Zwischenstück, 2.Peak als G 50/1, G 50/2 und G 50/3 bezeichnet; das andere Größenverhältnis zwischen den beiden Peaks erklärt sich aus den verschiedenen Dialysezeiten.

Abb. 10: Sephadex G 50 sf - Extinktionsverläufe bei 254 und 225 nm von 10 Tage dialysiertem Urin

Säulenparameter wie in Abb.9

Nach der Beschreibung des Herstellers trennt Sephadex G 50 sf in einem Molekulargrößenbereich von 1500 bis 30 000.
Der erste Peak erscheint nach einem Drittel des Säulenvolumens mit der Front, d.h. sein Molekulargewicht liegt an der oberen Grenze des Trennbereichs und darüber. Durch einen Lauf mit Referenzlösungen konnte sein Molekulargewicht als über 10^4 festgelegt werden.
Zu Beginn des zweiten Peaks erscheint Polyäthylenglykol1 (MG 5000 - 6000); Trypanblau (MG etwa 1000) wird am Ende des zweiten Peaks eluiert.
Dieser zweite Peak wird mit zunehmender Dialysezeit kleiner; wir haben ihn beim Vergleich gesund - krank nicht weiter berücksichtigt.

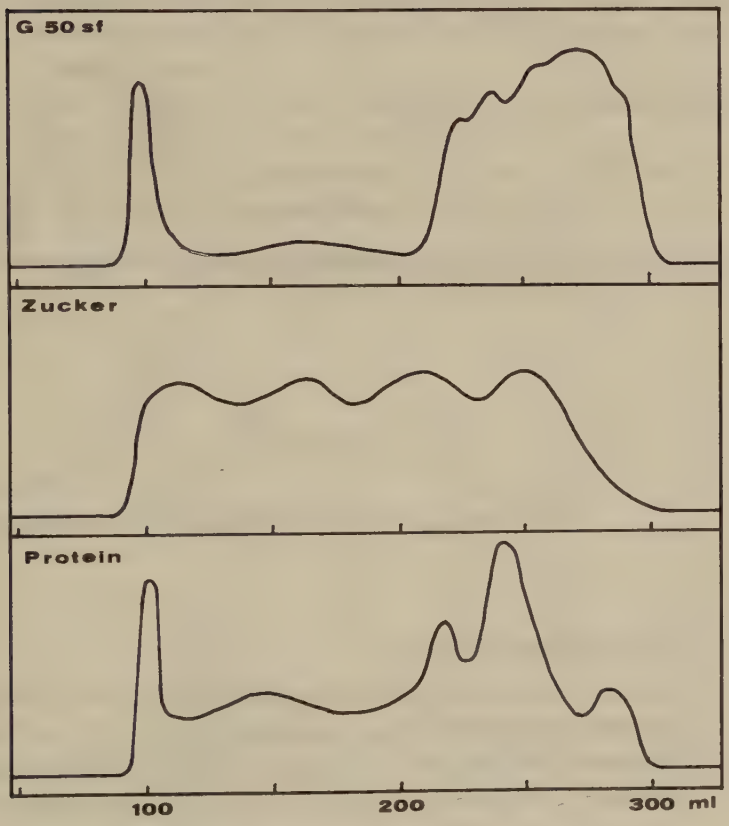
4.2.1.1.2. Proteinverteilung

Eine exakte Angabe über die Proteinverteilung erhielten wir durch Proteinbestimmung der Einzelfraktionen des Sephadex G 50 sf - Eluats mit dem Technicon-Autoanalyzer (Abb.11).

4.2.1.1.3. Zuckerverteilung

Mit der Orcinmethode ((90), s. 3.2.2.3.1.) bestimmten wir den Zuckergehalt aller Sephadex G 50 sf - Fraktionen und erhielten eine weitgehend gleichmäßige Verteilung (Abb. 11).

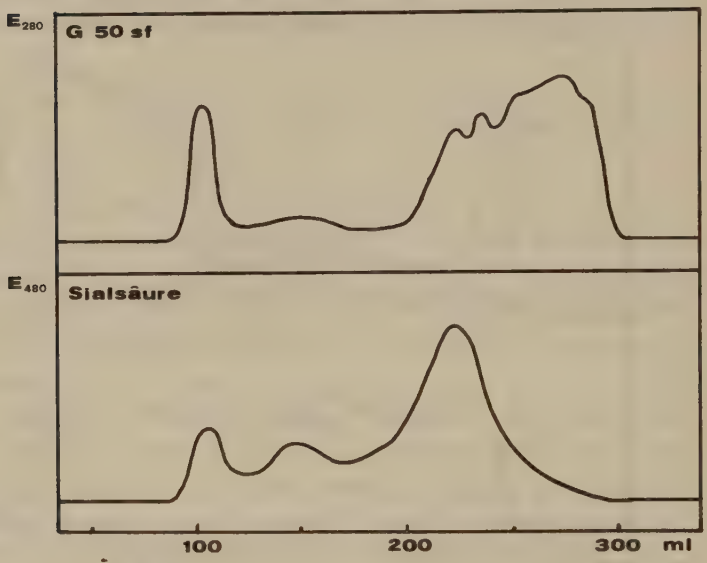
Abb.11: Zucker- und Proteinverteilung der Sephadex G 50 sf - Chromatographie
(Zur leichteren Orientierung ist auch die G 50 sf - Extinktion bei 280 nm abgebildet)



4.2.1.1.4. Sialsäureverteilung

Die Sialsäurebestimmung mit der Resorcin-Methode (81) ergab einen sialsäurereichen hochmolekularen Peak und einen zweiten Peak im vorderen Bereich von G 50/3.

Abb.12: Sialsäureverteilung der G 50 sf - Fraktionen (Zur Erleichterung ist die G 50 sf - Extinktion bei 280 nm mit angegeben)



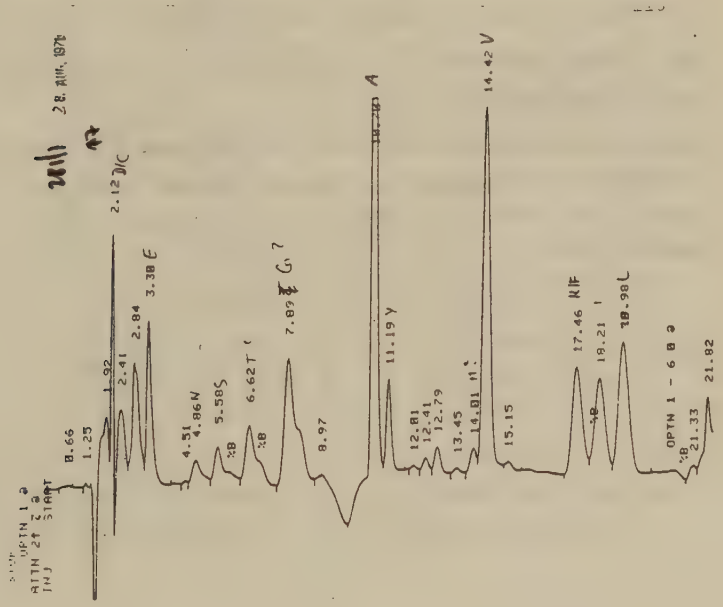
4.2.1.1.5. Elektrolytgehalt

Durch Messung der Leitfähigkeit konnte bei dem in Wasser durchgeführten Sephadex G 50 sf - Lauf die Elektrolytfreiheit des ersten Peaks und des Zwischenstücks festgestellt werden. Innerhalb des zweiten Peaks fand sich ein diskreter Elektrolytpeak.

4.2.1.1.6. Bestimmung der Heterogenität von G 50/1 und G 50/2 mit N-terminaler Aminosäureanalyse

Um Aufschluß über die Heterogenität der einzelnen Bereiche zu erhalten, führten wir N-terminale Aminosäureanalysen von G 50/1 und G 50/2 durch. Die Methode ist im experimentellen Teil näher beschrieben; pro Proteinmolekül wird die N-terminale Aminosäure abgespalten, so daß die Aminosäureverteilung der Proteinverteilung entspricht, d.h. es müssen mindestens ebenso viele Proteine vorliegen wie Aminosäuren.
Wir erhielten eine erhebliche Heterogenität beider Bereiche (vgl. Punkt 4.2.2.1.4.).
Die Aminosäurezusammensetzung von G 50/1 ist als HPLC-Ausdruck in Abb.13 wiedergegeben.

Abb.13: Aminosäureverteilung von G 50/1 (HPLC-Bild)



Zusammenfassung der Ergebnisse der Orientierungsuntersuchungen

Trennt man dialysierten, lyophilisierten und filtrierten Urin auf Sephadex G 50 sf auf, erhält man bei einer Extinktion von 280 oder 254 nm einen sialsäure- und proteinreichen, elektrolytfreien Frontpeak mit einem Molekulargewicht von über 10^4.

Der zweite Peak stellt ein Gemisch aus Peptiden und kohlehydrat- und sialsäurereichen anderen Bestandteilen des Urins dar. Er ist salzhaltig. Nach langer Dialyse wird dieser Bereich kleiner; sein Molekulargewicht liegt unter etwa 5000. Wir haben ihn bei der Suche nach Unterschieden zwischen gesunden und kranken Kindern nicht berücksichtigt.

Zwischen den beiden Peaks liegt ein Bereich mit niedrigen Sialsäurewerten und Proteinwerten. Die Substanzmenge dieses Zwischenbereichs liegt etwa 1 1/2 mal so hoch wie die des 1. Peaks.

Die Zucker zeigten eine gleichmäßige Verteilung in allen Fraktionen.

Alle drei Bereiche sind sehr heterogen. Die Heterogenität der Proteine der ersten beiden Bereiche haben wir durch N-terminale Aminosäureanalysen bestätigt.

4.2.1.2. Versuch einer weiteren Auftrennung des hochmolekularen Sephadex G 50 sf - Peaks (G 50/1)

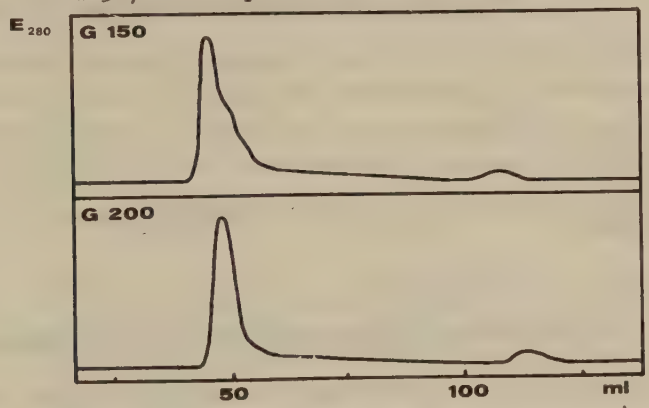
4.2.1.2.1. Gelchromatographie mit Sephadex G 150 und G 200

Zunächst versuchten wir eine weitere Auftrennung von G 50/1 nach der Größe der Bestandteile mit Gelchromatographie an Sephadex G 150 und G 200.

Diese Methode wurde von verschiedenen Autoren beispielsweise bei der Untersuchung von Immunglobulinen im Urin benutzt (8,16).

Bei Durchführung der Chromatographien in 0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, ergaben sich die in Abb.14 gezeigten Extinktionskurven.

Abb.14: Extinktionskurven der Chromatographien von G 50/1 an Sephadex G 150 und G 200



Gelbett: 1 cm x 120 cm, Totalvolumen: 94 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4
Durchfluß: 4 ml/Std., 30 Min.-Fraktionen
Probe: je 10 mg G 50/1-Substanz in 4 ml Puffer

Bei einem Vergleichslauf mit Eichsubstanzen zur Molekulargewichtsbestimmung lief der Hauptpeak vor bzw. noch gering überlappend mit den Immunglobulinen

(MG ca. 160 000), der zweite, kleine Peak erschien unmittelbar vor TSH (MG ca. 25 000).

Trotzdem besteht der Frontpeak überwiegend aus kleineren Proteinmolekülen als Immunglobulinen, wie wir elektrophoretisch zeigen konnten (s. Ergebnisse, Punkt 4.2.2.1.3.). Man muß wohl eine Molekülaggregation annehmen (s. auch McGale (49)), die insbesondere auch beim Lyophilisieren zustande kommen kann.

Anmerkung: Chromatographien in aggregationshemmenden, dissoziierenden Pufferlösungen wie beispielsweise hochmolekularer Harnstofflösung kamen für uns wegen Gefährdung eventueller biologischer Aktivitäten nicht in Frage.

4.2.1.2.2. Ionenaustauschchromatographie an CM 23 - Cellulose

Beim Versuch, G 50/1 mit Ionenaustauschchromatographie auf CM 23 - Cellulose in Pyridin - Acetat - Puffer bei einem pH-Gradienten von pH 4 bis pH 6 zu trennen, wurde die gesamte Substanz mit der Front eluiert, eine Auftrennung kam nicht zustande.

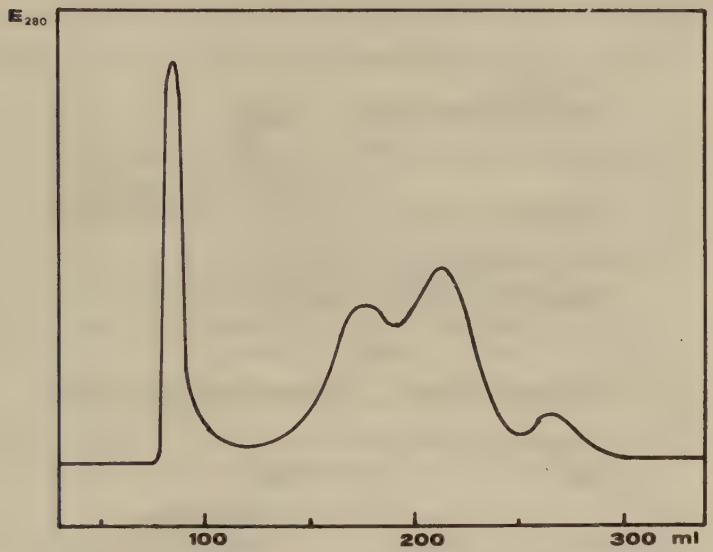
4.2.1.2.3. Ionenaustauschchromatographie an DEAE - Sepharose

Ein Trennungsversuch über DEAE - Sepharose in Tris-HCl-Puffer bei einem pH - Gradienten von 9 bis 6 führte zu keinem Ergebnis; die gesamte Probe wurde mit der Front eluiert.

4.2.1.2.4. Chromatographie auf Sepharose 4 b

Ein Trennungsversuch von G 50/1 auf Sepharose 4 b zeigte bei pH 7 in Tris - HCl - Puffer folgende Auftrennung:

Abb.15: Sepharose 4 b - Chromatographie von G 50/1, Extinktionsverlauf bei 280 nm



Gelbett: 2 cm x 75 cm, Totalvolumen: 236 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4
Durchfluß: 27 ml/Std., 20 Min.-Fraktionen
Probe: 50 mg G 50/1-Substanz in 4 ml Puffer

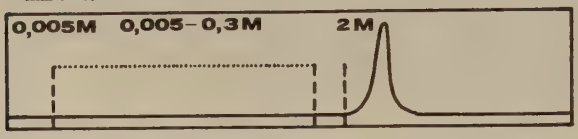
Bei dem ersten Peak handelt es sich im wesentlichen um hochmolekulare Zucker. Außerdem sind, wie eine Aminosäureanalyse (s. exp. Teil, Punkt 3.2.2.5.) gezeigt hat, auch Proteine enthalten. Die restlichen Peaks bestehen vor allem aus Proteinen, die N-terminalen Aminosäurebestimmungen zeigten eine deutliche Heterogenität aller Bereiche.

4.2.1.2.5. Ionenaustauschchromatographie an DEAE - Cellulose

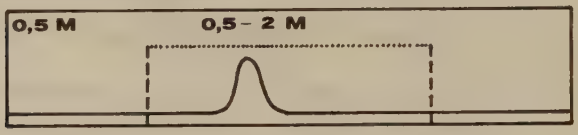
Entsprechend der von Bourrillon et al.(14) beschriebenen Methode führten wir Trennungsversuche von G 50/1 mit drei verschiedenen Molaritätsgradienten bei konstantem pH von 7,4 durch. Die Elutionsverläufe mit den entsprechenden Molaritätsgradienten sind in Abb. 16 wiedergegeben.

Abb. 16: Chromatographie von G 50/1 an DEAE - Cellulose

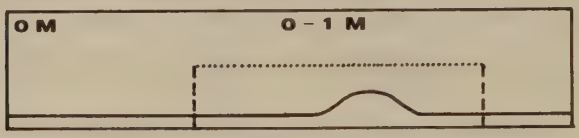
a) Molaritätsgradient 0,005 bis 0,3 M, nachgewaschen mit 2 M



b) Molaritätsgradient 0,5 bis 2 M



c) Molaritätsgradient 0 bis 1 M



bei allen Versuchen: Gelbett: 1 cm x 25 cm, TV 20 ml
Elutionsmittel:
Phosphatbasispuffer 0,01 M, pH 7,4
bei versch. NaCl-Molaritäten
Durchfluß: 40 ml/Std.
Probe: je etwa 20 mg G 50/1 - Substanz in 5 ml Puffer

Die Substanz wurde immer als einheitlicher Peak eluiert; eine Auftrennung war uns nicht möglich.

Anmerkung: Als eventuelle Gründe dafür, daß uns die Methode im Gegensatz zu Bourrillon (14) nicht gelang, seien kurz angedeutet:
Durch die von Bourrillons Gruppe vorher durchgeführten Fällungen mit Äthanol und Ammoniumsulfat kann die Aggregationsneigung der Proteine abgenommen haben. Da wir nur den hochmolekularen Teil auftrennen wollten, benutzten wir nur einen Teil der Urinproteine. Während die Autoren die Molarität des Elutionsmittels stufenweise erhöhten, benutzten wir stufenlose Gradienten.

4.2.1.2.6. Affinitätschromatographie mit Concanavalin A - konjugierter Sepharose

Concanavalin A ist ein Pflanzenlectin, das unter Anwesenheit von Mn^{2+}- und Ca^{2+}- Ionen spezifisch Polysaccharide und Glykoproteine bindet, die α-mannosidische Kohlenhydratstrukturen besitzen. Diese primär gebundenen Substanzen können durch Nachwaschen mit α-D-Methylmannosid eluiert werden.

Mit dieser Methode gelang eine Auftrennung von G 50/1 in zwei Peaks:

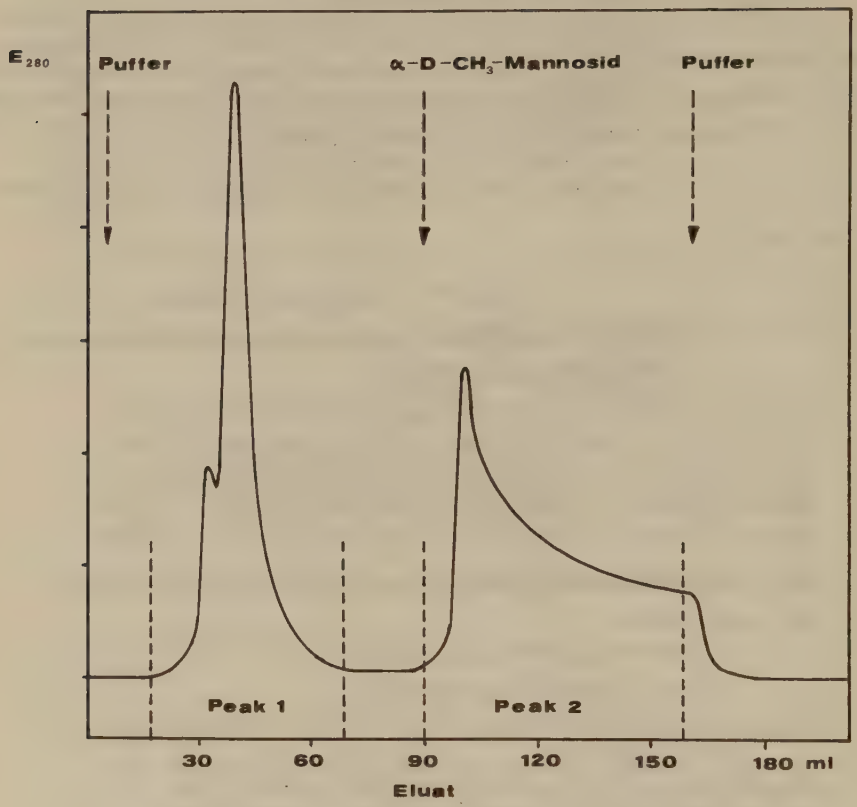
Peak 1 von 20 bis 70 ml,

Peak 2 von 90 bis 160 ml.

Diese beiden Peaks sind in Abb. 17 gekennzeichnet.

Beide Peaks sind hexose- und sialsäurehaltig. Da Albumin und die Immunglobuline (außer IgM) nicht an Con A gebunden werden, werden sie im ersten Peak eluiert, d.h. der zweite Peak ist albumin- und antikörperfrei.

Abb. 17: G 50/1-Chromatographie an Con A - Sepharose
Extinktionsverlauf bei 280 nm

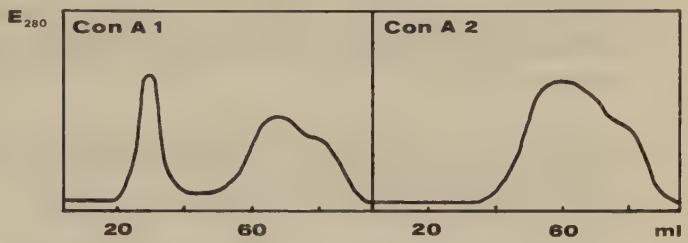


Gelbett: 1 cm x 15 cm, Totalvolumen 12 ml
Durchfluß: 60 ml/Std., 15 Min.-Fraktionen
Lauf unter Wasserkühlung (etwa 10°C)
Puffer: 0,1 M Na-Acetat pH 6,5
0,1 M NaCl
0,001 M $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$
zum Eluieren der adsorbierten Substanzen
zusätzlich 0,1 M α-D-Methylmannosid

4.2.1.2.7. Sepharose 4 b - Chromatographie der Con A - Peaks

Chromatographie der Con A - Peaks 1 und 2 an Sepharose 4 b ergibt eine deutliche Abtrennung des Frontzackens von Con A 1 als zuckerreichen, sialsäurehaltigen Peak. Chromatographie von Con A 2 ergibt keine besondere Auftrennung.

Abb.18: Chromatographie von Con A 1 und Con A 2 an Sepharose 4 b



Gelbett: 1 cm x 80 cm, Totalvolumen: 63 ml
Elutionsmittel: Tris-HCl-Puffer, 0,02 M, pH 7,4
Durchfluß: 12 ml/Std., 20 Min.-Fraktionen
Probe: 4 - 5 mg Con A 1 bzw. Con A 2 - Substanz in 1 ml Puffer

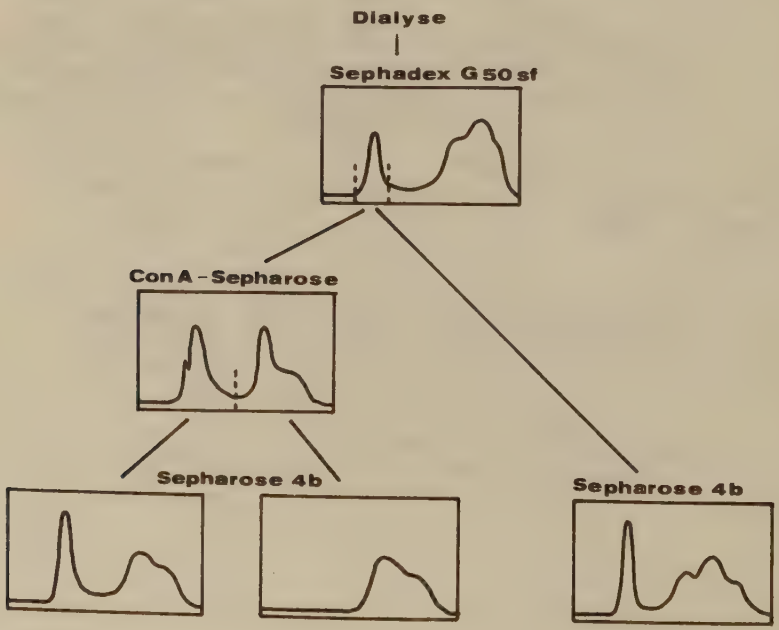
Zusammenfassung der Auftrennungsversuche

Mit Gelchromatographie an Sephadex G 50 sf läßt sich nach Dialyse eine erste grobe Auftrennung der Urinbestandteile in drei Bereiche erreichen. Gelchromatographie an Sephadex G 150 und G 200 bringt praktisch keine Verbesserung, ist aber langwieriger.

Eine weitere Auftrennung des ersten, hochmolekularen G 50 sf - Peaks (G 50/1) gelingt mit Concanavalin A - Sepharose und/oder Sepharose 4 b.

Mit CM 23 - Cellulose, DEAE-Cellulose und DEAE-Sepharose gelang uns in physiologischen Puffermedien keine Auftrennung.

Schema des durchgeführten Trennungsgangs der hochmolekularen Urinbestandteile:



Zwischen den einzelnen Chromatographien jeweils Entsalzung an Sephadex G 10 und Gefriertrocknung

4.2.2. SUCHE NACH UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN HOCHMOLEKULAREN URINBESTANDTEILEN GESUNDER MÄDCHEN UND KRANKER MÄDCHEN IM SCHUBFREIEN INTERVALL

4.2.2.1. Suche nach biochemischen Unterschieden

4.2.2.1.1. Quantitative Sialsäurebestimmung

Mit der Thiobarbitursäuremethode (3) untersuchten wir den Gehalt an gebundener Sialsäure von G 50/1 von den Urinen von 4 gesunden Mädchen und 4 kranken Mädchen im schubfreien Intervall quantitativ und vergleichend.

Die Zahlenwerte der beiden Gruppen gesund - krank sind in Tabelle 4 angegeben; sie verstehen sich als Mikrogramm Sialsäure pro Milligramm Substanz.

Tab. 4: Sialsäuregehalt von G 50/1 ($\mu g/mg$)

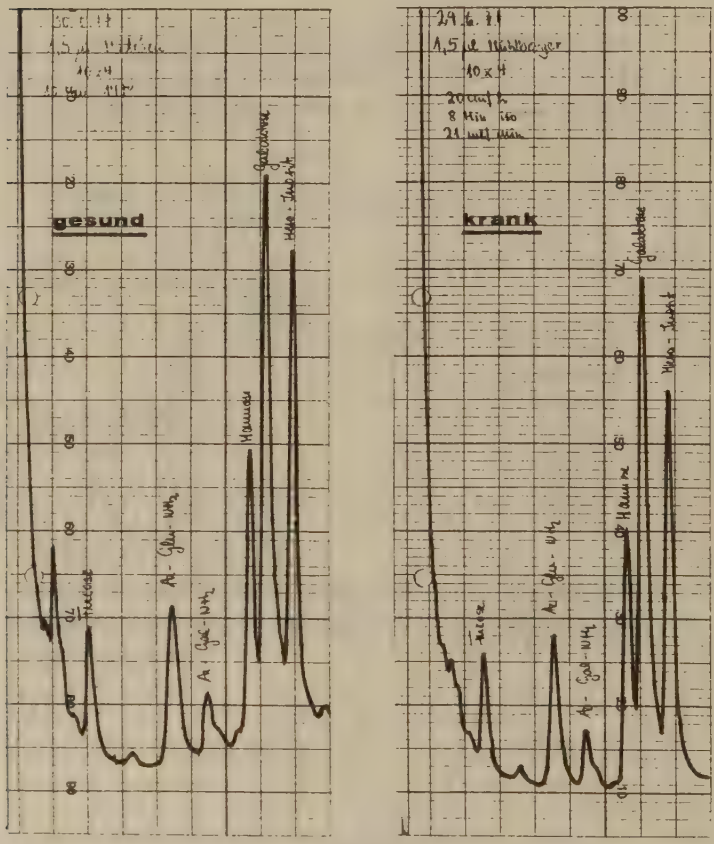
	1. Bestimmung	2. Bestimmung	Mittelwert
Gesund 1	116	134	125
Gesund 2	105	97	101
Gesund 3	106	107	107
Gesund 4	96	102	99
Krank 1	103	90	97
Krank 2	117	113	115
Krank 3	89	95	92
Krank 4	107	107	107

Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht erkennbar (Mittelwerte Gesund - Krank: 108 bzw. 103).

4.2.2.1.2. Zuckeranalysen

Besonders auch im Hinblick auf die von Salit und Gotschlich (59, siehe Diskussion) beschriebene attachmenthemmende Wirkung von Zuckern, insbesondere d-Mannose, führten wir vergleichende Zuckeranalysen von G 50/1 von gepooltem Material Gesunder und dem eines repräsentativen kranken Mädchens nach der von Porter (58) beschriebenen Methode durch. Abb.19 gibt die durch Gaschromatographie erhaltenen Chromatogramme wieder.

Abb.19: Gaschromatogramm der Hexosen- und Hexosaminverteilung von G 50/1 von gesundem und krankem Material



Im wesentlichen sind enthalten:
Fucose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin, N-Acetylglucosamin und die im besonderen interessierende Mannose. Meso-Inosit wurde als interner Standard mitgeführt.
Ein deutlicher Unterschied zwischen Gesund und Krank besteht nicht.

4.2.2.1.3. Elektrophoresen

SDS - Gelelektrophoresen nach Furthmayr und Timpl (33), die eine Trennung nach dem Molekulargewicht ermöglichen, zeigten im hochmolekularen Bereich keine deutlichen Unterschiede zwischen dem Material von 4 gesunden und 4 kranken Mädchen.

Die Bedingungen waren so gewählt, daß hauptsächlich die Uringlykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 30 000 bis 200 000 zur Darstellung kamen.

Die Abbildungen 20, 21 und 22 zeigen die Elektrophoresebanden von G 50/1, sowie Con A 1 und Con A 2.

Durch das quantitativ starke Überwiegen der kleineren Substanzen traten Molekülgrößen von über 10^5 nur noch in nicht mehr anfärbbaren Mengen auf. Eine Wiederholung der Elektrophoresen mit Darstellung speziell der Moleküle über MG 10^5 war aus technischen Gründen nicht möglich.

Beim Vergleich zwischen Gesunden und Kranken scheinen bei den Kranken relativ mehr kleinere Moleküle (kleiner als 50 000) gegenüber größeren vorzuliegen.

Abb.20: SDS-Gelelektrophoresen von G 50/1
Vergleich Gesund - Krank

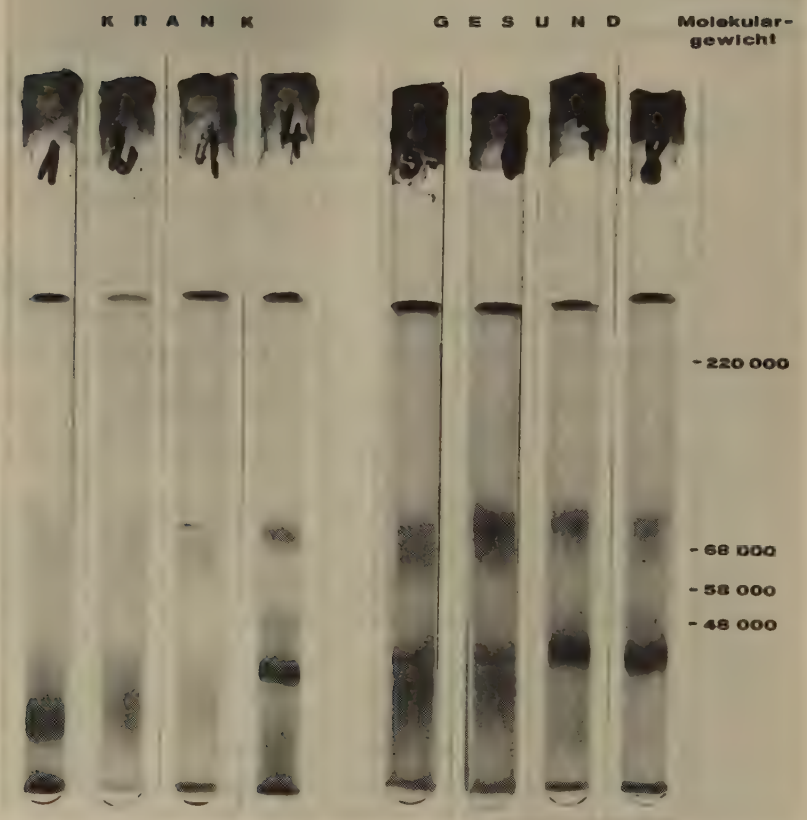
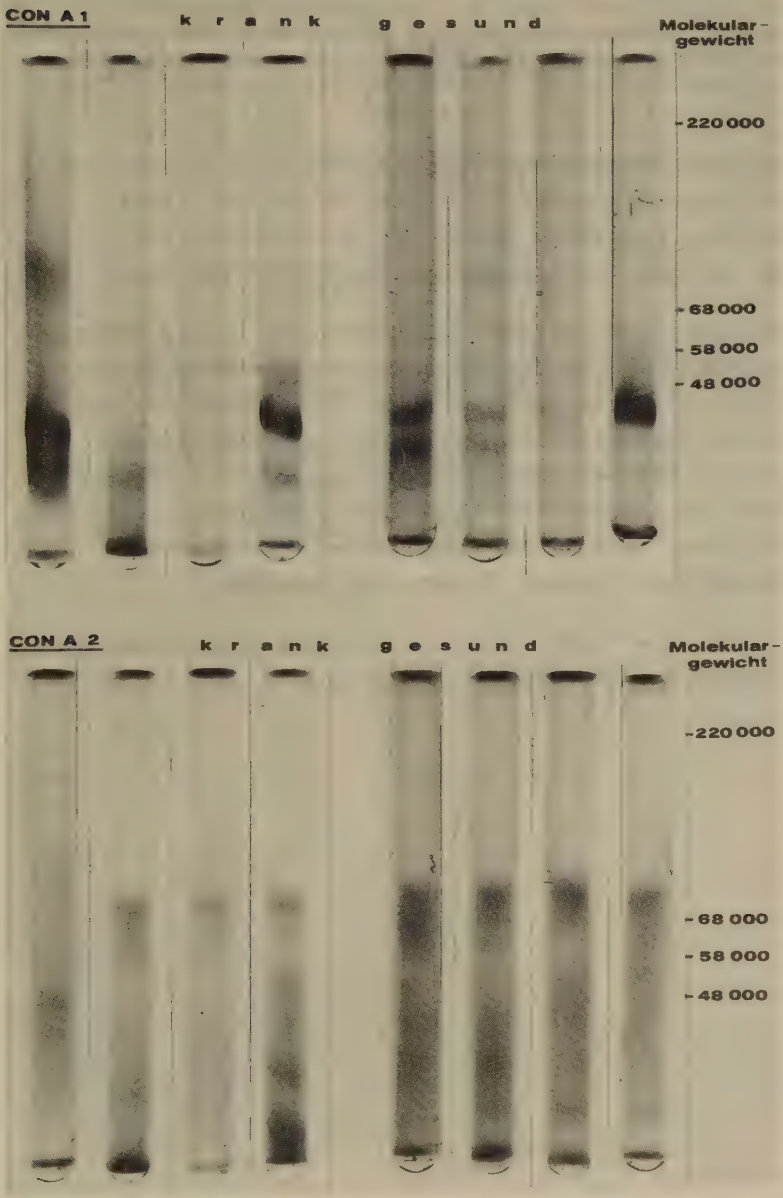


Abb.21 und 22: SDS-Gelelektrophoresen von Con A 1 und 2



4.2.2.1.4. N-terminale Aminosäurebestimmungen

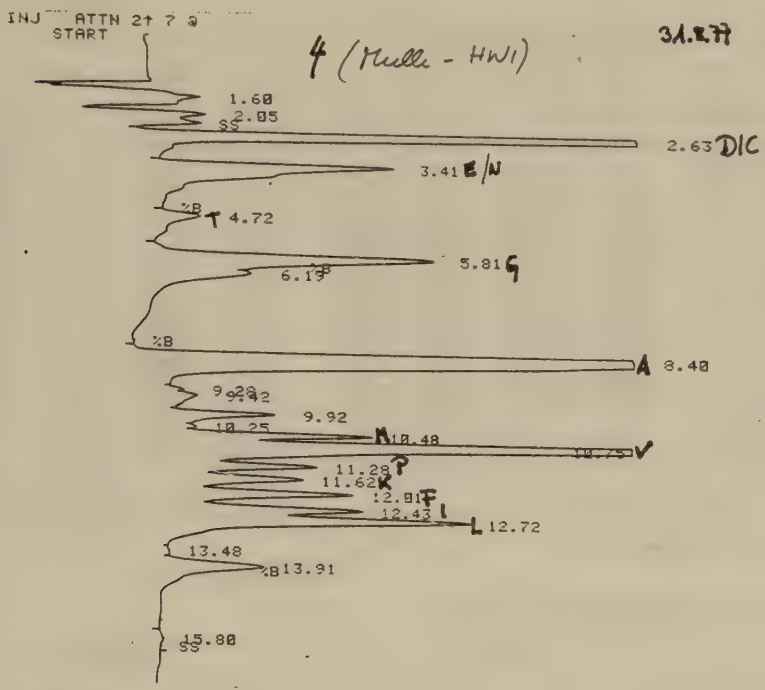
Bei diesem Test wird die N-terminale Aminosäure jedes Proteins oder Peptids abgespalten und quantitativ bestimmt, wodurch man über die Aminosäureverteilung Information über die Heterogenität und quantitative Verteilung der Proteine erhält.

Die Bestimmungen für G 50/1 führten wir automatisch mit dem Sequenator in 4 Schritten bis zur viert-letzten Aminosäure durch, die Bestimmungen für G 50/2 aus technischen Gründen in 2 Schritten per Hand.

Abb. 23 zeigt das HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) - Bild der Aminosäurezusammensetzung von G 50/2 eines kranken Mädchens. Gleichzeitig werden automatisch die Flächenintegrale ausgedruckt, wodurch man die Mengen erhält. Durch einen Vergleichslauf mit einem Aminosäure - Eichgemisch lassen sich die verschiedenen Aminosäuren den verschiedenen Zahlen bzw. Flächen (s.Abb. 23) zuordnen.

In Tab. 5 - 8 sind die verschiedenen Aminosäuren in Prozent der Gesamtmenge angegeben.

Abb.23: N-terminale Aminosäureverteilung von G 50/2 eines kranken Mädchens (HPLC - Ausdruck)




```
    1080A

    RUN #    1
AREA %

   RT          AREA       AREA %

 1.60          22590        0.921
 2.05          12020        0.490
 2.63         280500       11.439
 3.41         182900        7.459
 4.72          52980        2.161
 5.81         168400        6.868
 6.19          93000        3.793
 8.40         489500       19.963
 9.28          12950        0.528
 9.42          41370        1.687
 9.92          61070        2.491
10.25          14220        0.580
10.48          74000        3.018
10.75         364700       14.873
11.28          69900        2.851
11.62          75520        3.080
12.01          90820        3.704
12.43          87100        3.552
12.72         168300        6.864
13.48          10420        0.425
```

Tab. 5 - 8: Die einzelnen N-terminalen Aminosäuren in % der jeweiligen Gesamtmenge

Tab. 5: G 50/1, 1. Schritt

	Krank				Gesund			
Aminosäure	1	2	3	4	1	2	3	4
Asp/Cys	5,25	6,99	12,35	5,11	5,02	3,73	3,87	6,05
Glu	4,14	7,84	2,48	5,79	16,26	6,84	7,11	11,30
Agn	3,31	2,74	3,42	1,20	3,30	0,61	0,80	1,05
Ser	2,77	1,74	1,40	2,59	3,33	0,43	0,65	1,16
Thr	4,63	1,63	2,20	4,65	0,61	1,54	2,59	1,36
Gly	17,40	4,54	1,54	9,31	3,30	4,24	5,09	5,61
Ala	6,74	12,07	8,20	16,16	7,40	12,76	10,45	11,09
Tyr	2,79	4,25	4,58	2,17	1,85	6,21	6,38	2,48
Met	2,56	1,91	0,43	0,57	0,97	0,84	0,47	0,39
Val	5,18	11,94	13,79	10,40	3,41	13,61	13,98	5,59
Lys/Phe	5,19	6,81	6,69	4,21	2,06	6,20	8,26	1,79
Ile	4,17	5,11	3,41	3,92	1,84	4,77	4,86	2,78
Leu	5,43	8,01	6,49	5,33	2,95	6,57	6,74	2,82

Die nicht aufgeführten Aminosäuren lagen in nicht bestimmbaren Mengen vor.

Tab. 6: G 50/1, 2. Schritt

	Krank				Gesund			
Aminosäure	1	2	3	4	1	2	3	4
Asp/Cys	7,19	4,70	6,54	4,41	5,03	3,73	4,38	4,63
Glu	8,64	9,60	10,29	8,88	7,03	13,83	10,25	13,00
Agn	2,22	0,95	0,87	1,47	1,95	1,11	0,69	0,94
Ser	2,05	1,42	0,92	1,28	4,36	0,87	0,49	1,16
Gln	1,75	1,49	1,13	1,70	0,92	0,43	0,91	1,20
Thr	6,19	4,88	4,36	5,19	7,12	1,31	3,04	5,60
Gly	9,12	7,47	7,88	7,77	12,93	1,80	3,77	4,31
Ala	9,08	11,06	13,47	8,71	5,10	9,91	8,70	8,01
Tyr	4,80	5,18	2,39	3,47	6,10	4,06	4,80	2,97
Met	1,98	1,19	0,50	0,70	2,31	0,92	1,08	1,10
Val	10,08	14,97	17,46	10,91	9,72	13,10	13,27	6,32
Pro	1,99	2,16	1,85	2,35	5,87	2,82	3,70	3,69
Lys/Phe	2,14	3,13	2,95	4,29	2,36	1,97	1,79	1,67
Ile	4,40	4,90	4,48	2,64	4,03	4,70	4,00	3,26
Leu	5,72	7,02	5,93	8,50	9,11	3,97	4,08	2,57

Die nicht aufgeführten Aminosäuren lagen in nicht bestimmbaren Mengen vor.

Tab.7: G 50/ 2, 1. Schritt

	Krank				Gesund			
Aminosäure	1	2	3	4	1	2	3	4
Asp/Cys	6,44	7,95	5,60	2,88	4,57	5,98	4,27	9,48
Glu	6,33	4,79	6,17	4,10	4,34	3,46	3,92	5,29
Agn	2,62	2,89	2,44	2,50	2,35	2,32	2,70	2,22
Ser	1,46	2,49	2,74	2,84	2,01	2,10	2,08	2,37
Thr	3,01	4,72	4,49	2,65	3,26	3,33	4,83	2,43
Gly	12,05	18,37	20,62	23,04	23,49	30,01	24,80	28,00
Ala	7,94	8,20	7,87	11,03	6,68	8,06	6,37	8,47
Tyr	3,92	4,91	3,78	3,86	5,29	3,95	4,43	4,62
Met	1,22	1,77	1,70	2,52	2,71	1,32	1,61	2,17
Val	6,07	8,58	6,89	5,29	4,90	6,11	5,67	4,86
Pro	3,19	3,85	3,75	3,08	1,81	3,34	4,11	3,51
Lys	2,16	1,87	1,95	2,53	2,06	2,42	2,70	2,19
Phe	2,34	4,16	3,27	2,94	3,06	2,66	3,35	2,46
Ile	2,93	4,52	4,06	3,41	4,28	1,36	3,63	3,15
Leu	4,13	6,68	7,07	5,17	1,59	4,42	5,17	4,01

Die nicht aufgeführten Aminosäuren lagen in nicht bestimmbaren Mengen vor.

Tab.8: G 50/ 2, 2. Schritt

	Krank				Gesund			
Aminosäure	1	2	3	4	1	2	3	4
Asp/Cys	8,01	6,04	7,01	4,02	4,69	3,65	2,09	5,21
Glu	7,13	2,21	0,81	6,14	6,55	6,52	1,89	6,49
Agn	3,86	4,18	2,72	4,36	3,90	5,20	3,80	2,93
Ser	0,76	0,84	0,79	1,11	0,63	0,90	1,02	0,80
Gln	1,19	1,05	0,43	1,48	1,24	1,16	1,30	0,96
Thr	1,57	3,94	1,49	2,49	2,12	1,40	2,88	2,06
Gly	17,06	11,88	13,68	11,83	16,28	16,59	9,89	10,40
Ala	15,68	15,41	16,63	16,69	14,89	16,92	17,12	15,97
Tyr/Met	0,81	1,04	0,67	0,82	0,40	0,58	0,93	0,49
Val	6,95	13,28	11,92	10,34	12,62	7,21	14,60	11,94
Pro	18,38	10,07	13,90	12,30	12,71	18,49	17,62	12,40
Phe	2,21	2,08	2,83	3,95	2,21	2,18	2,14	2,90
Ile	2,61	3,06	3,72	3,38	3,58	2,67	2,54	3,27
Leu	4,98	6,66	8,47	7,91	6,29	6,28	5,81	5,08

Die nicht aufgeführten Aminosäuren lagen in nicht bestimmbaren Mengen vor.

Der Vergleich der Zahlenwerte der Kranken mit denen der Gesunden zeigt starke Schwankungen und Unterschiede; bei G 50/1, 2.Schritt beispielsweise würde der Unterschied des Prolinanteils die Signifikanzkriterien des Wilcoxon-t-Tests erfüllen.
Da die aufgeführten Zahlenwerte Relativprozent darstellen, die Aminosäurebestimmungen bei Wiederholung größere Differenzen aufweisen und die physiologischen Schwankungen hoch sind, sollte man unterschiedliche Prozentwerte jedoch zurückhaltend interpretieren. Sie können Ausdruck bestehender Unterschiede sein, müssen es aber nicht.

Eine empfindliche biologische Testmöglichkeit scheint Voraussetzung für die sichere Interpretation solcher Zahlenwerte zu sein; eine gute Möglichkeit, auch geringe Unterschiede des Proteinmusters biochemisch zu erfassen, ist mit diesem Test gegeben (vgl. auch Diskussion).

Zusammenfassung der biochemischen Untersuchungen auf Unterschiede

Bei den Sialsäurebestimmungen von G 50/1 konnten keine quantitativen Unterschiede zwischen Gesunden und Kranken festgestellt werden. Der Sialsäuregehalt von G 50/1 liegt relativ konstant bei etwa 100 µg/mg Substanz.

Auch die vergleichenden Zuckeranalysen lieferten keine klaren Unterschiede. Mannose ist bei Gesunden und Kranken enthalten.

Bei den SDS-Gelelektrophoresen und N-terminalen Aminosäurebestimmungen zeigten sich gewisse Unterschiede, die jedoch ohne Zusatzinformation etwa in Form eines empfindlichen biologischen Tests nicht sicher interpretiert werden können.

Die N-terminale Aminosäureanalyse stellt eine empfindliche Methode dar, eine einem biologischen Unterschied zugrundeliegende geringfügige Veränderung der Proteinzusammensetzung nachzuweisen.

4.2.2.2. Biologischer in-vitro-Attachment-Test

Eine mögliche attachmentbeeinflussende Wirkung von Uringlykoproteinen oder anderen hochmolekularen Substanzen prüften wir vergleichend zwischen den Substanzen aus Lyophilisat von dialysierten Urinen Gesunder und Kranker in einem in-vitro-Test.

Wir verwandten dazu in leichter Abänderung die von Svanborg Edén (75) und Svanborg Edén et.al.(76,78) beschriebene Methode. Dabei ließen wir Epithelzellen und E.coli-Stamm konstant und gaben Material von G 50/1 und G 50/2 bzw. von Con A 1 und Con A 2 dazu.

Tab. 9 zeigt die von uns bestimmten durchschnittlichen Bakterienzahlen pro Zelle, ausgedrückt als Prozentsatz der bei jeder Bestimmung als Standard mitgeführten Zahl der ohne Zugabe von Urinsubstanzen adhärierenden Bakterien. Die durchschnittliche absolute Bakterienzahl der Standards lag in der Größenordnung von etwa 40.

Die genauen Bedingungen sind im methodischen Teil unter Punkt 3.3. beschrieben.

Tabelle 9: Biologischer in-vitro-Attachment-Test:

Durchschnittliche Zahl der pro Zelle adhärierenden Bakterien in Prozent, bezogen auf einen als 100 % gesetzten, ohne Zugabe von Urinsubstanzen mitgeführten Standard

Zugabe von	Bestimmung	Konz. (mg/ml)	krank						gesund					
			Kind1	2	3	4	Standard-abw.	Mittel-wert	Mittel-wert	Standard-abw.	Kind1	2	3	4
G 50/1	1.Best.	0,05	113	98	69	125	24,17	101,25	82,25	35,39	44	126	66	93
		0,5	95	80	74	96	10,97	86,25	93,50	21,98	64	115	91	104
	2.Best.	0,5	70	82	53	155	44,94	90,00	162,25	46,23	95	169	190	195
		2,0	47	88	42	88	25,20	66,25	49,00	19,41	35	31	72	58
	3.Best.	0,5	52	59	89	103	24,24	75,75	71,50	12,12	88	59	68	71
		0,5	121	94	91	134	20,93	110,00	95,50	35,93	103	48	135	96
	4.Best.	0,5	104	106	106	99	3,30	103,75	86,75	30,17	52	71	112	112
Con A1	1.Best.	0,5	148	78	104	123	29,61	113,25	90,75	8,42	87	103	84	89
Con A2	1.Best.	0,5	98	133	104	150	24,51	121,25	95,00	13,44	95	76	105	104
G 50/2	1.Best.	0,05	141	110	80	78	29,69	102,25	97,50	57,04	159	40	59	132
		0,5	61	134	88	110	31,14	98,25	165,50	76,33	143	237	68	214

Der Vergleich der Zahlenwerte zeigt starke Schwankungen sowohl zwischen den einzelnen Kindern als auch den einzelnen Bestimmungen.

Besonders die Betrachtung der Zahlen nach Zugabe von Substanzen von Con A 1 und Con A 2 deutet auf stärkeres bakterielles Attachment bei den Kranken im Vergleich zu den Gesunden hin. Wegen der geringen Fallzahl ist die Signifikanz dieses Unterschiedes jedoch unsicher.
Der Vergleich der Mittelwerte nach Zugabe von G 50/1 - Substanzen läßt ebenfalls meist höhere Attachment-Zahlen bei den Kranken erkennen. Da die Con A - Substanzen Teilmengen der G 50/1 - Substanzen sind, erhärtet diese Beobachtung den oben genannten Unterschied.

Nach Zugabe der niedrigermolekularen G 50/2 - Substanzen lassen sich keine Unterschiede feststellen.

Zur Problematik und zu den Fehlermöglichkeiten dieses Tests vgl. Punkt 3.3.2., 'Anmerkung'.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zu der Frage liefern, inwieweit eine lokale Abwehrschwäche für das Zustandekommen chronisch rekurrierender HWI im Kindesalter bei Mädchen mitverantwortlich ist.

Ausgehend von einer vergleichenden Orientierungsuntersuchung der bakteriellen Periurethralflora von gesunden und kranken Probandinnen im akuten Schub und im schubfreien Intervall, bei der wir deutliche Unterschiede zwischen den drei Gruppen feststellen konnten, versuchten wir als Konsequenz der unterschiedlichen Besiedelung der Frage nach dem morphologischen Korrelat davon bzw. der bei den disponierten Kindern vermuteten lokalen Abwehrschwäche nachzugehen.

Über Periurethralflora ist in den letzten 10 Jahren bei zunehmender Vermutung eines aszendierenden Infektionsweges eine Reihe von Veröffentlichungen erschienen, in denen meist bei erwachsenen Frauen die Prävalenz gramnegativer Darmbakterien, in einigen Fällen auch von Enterokokken untersucht wurde. Die Ergebnisse sind teils widersprüchlich, die meisten Autoren vermuten jedoch gewisse Unterschiede zwischen Gesunden und Kranken.

Ob diese unterschiedliche periurethrale Kolonisation aber Voraussetzung oder erleichternde Vorbedingung für die Bakterienaszension ist oder sichtbare Begleiterscheinung einer im gesamten ableitenden Harnsystem vorherrschenden Abwehrschwäche, oder ob noch komplexere Zusammenhänge bestehen, ist ungeklärt.

Wenn man auf die Entwicklungsgeschichte zurückblickt, ließe sich aus dem gemeinsamen ontogenetischen Ursprung von Harnblase, Harnröhre und Epithel des Scheidenvorhofs durch Ausfall eines protektiven Faktors eine Abwehrschwäche des gesamten unteren Harntrakts erklären. Die Kloake wird durch Einwachsen des Septum urorectale in Rectum und ventralen Kloakenrest geteilt, der sich wiederum zu Harnblase, primärer Harnröhre und dem Sinus urogenitalis, aus dem sich bei der Frau das Epithel des Scheidenvorhofs entwickelt, differenziert (45).

Als ersten waren Stamey et al. (74) 1971 eine unterschiedliche bakterielle Periurethralbesiedelung aufgefallen, auf die Stamey in späteren Arbeiten dann immer wieder hinwies: Er konnte bei wenigstens 50 % der Patientinnen in den Abstrichen Enterokokken nachweisen, während die gesunden Kontrollen kaum mit Enterokokken besiedelt waren. Zahl und Häufigkeit gramnegativer Darmbakterien nahm vor Auftreten der Bakteriurie deutlich zu, bei gesunden Probandinnen traten gramnegative Darmbakterien nur selten und meist nur in geringer Zahl auf. Bei einer 1970 durchgeführten Untersuchung fanden sich in 4 von 30 Fällen gramnegative Darmbakterien, in keinem Fall Enterokokken (28).
Auch Bruce et al. (15) fanden 1973 bei Patientinnen in 30 % Darmbakterien und in 35 % Enterokokken, während die Kontrollen nur in je 12 % eine Besiedelung zeigten. In einer 1975 durchgeführten Untersuchung konnten Stamey und Sexton (71) die Tendenz der Ergebnisse von 1971 bestätigen: bei Kontrollen fanden sie in 22,5 % der Abstriche E.coli und in 16,5 % Streptokokken, bei Patientinnen dagegen E.coli in 53,5 %, Enterokokken in 47,0 % der Fälle.

Bailey et al. (6) wiesen eine höhere Prävalenz von Darmbakterien bei Patientinnen gegenüber gesunden Kontrollen nach. Eine höhere E.coli-Besiedelungshäufigkeit bei Patientinnen wurde auch von Elkins und Cox (26) bestätigt. Die Enterokokkenprävalenzen dieser Autoren waren jedoch nahezu gleich. Kein Unterschied in der Besiedelung wurde von der Gruppe um Cattel und O'Grady gefunden (18,56).

Kinder wurden bisher noch kaum untersucht.
In einer 1977 erschienenen Arbeit beschrieben Köllermann et al. (44) bei gesunden Mädchen von 7 - 14 Jahren eine E.coli-Prävalenz von 1 von 20 bzw. Enterokokkenprävalenz von 2 von 20 Fällen, was nahezu exakt den Befunden an unseren gesunden Kontrollen entspricht.
Ein Jahr vorher schon haben Bollgren und Winberg (11) die Ergebnisse ihrer Untersuchungen der Periurethralflora an einer großen Zahl von gesunden Kindern veröffentlicht: Unter anderem werden bei der weit überwiegenden Zahl der Mädchen über 5 Jahren keine oder nur wenige gramnegative Bakterien oder Enterokokken festgestellt. Aufbauend auf diese Arbeit wurde dann in einer Longitudinalstudie die Periurethralflora von 13 Mädchen mit einer Disposition zu rekurrierenden HWI untersucht, bis 7 Mädchen eine Infektion entwickelt hatten (12). Das interessante Hauptergebnis war eine dichte Besiedelung mit meist mehreren Spezies gramnegativer Darmbakterien einige Tage, bevor die Infektion auftrat. Enterokokkenbesiedelung wurde hier bei 4 von 13 Patienten gefunden. Die Kinder, die keine Infektion entwickelten, hatten nur wenige oder keine gramnegativen Darmbakterien in der Periurethralregion.

Bei unseren eigenen Untersuchungen der Periurethralflora von Mädchen zwischen 5 Jahren und Menarche konnten wir deutliche Unterschiede zwischen den gesunden und kranken Kindern mit und ohne momentaner Infektion in der Enterokokkenprävalenz feststellen: etwa 2/3 der akut Erkrankten wiesen Enterokokken als Begleitflora auf, etwa 1/3 der Kinder im schubfreien Intervall und nur 1 von 20 der Gesunden. Außerdem zeigte die Prävalenz der gramnegativen Darmbakterien Unterschiede: im akuten Schub fanden wir erwartungsgemäß bei allen Kindern gramnegative Darmbakterien, im schubfreien Intervall bei knapp 1/3 (10/36), dagegen nur in einem von 20 Fällen bei den gesunden Kindern. Auch quantitativ nahm die Bakterienzahl in der Reihe gesund - schubfrei - akuter Schub zu.

Unsere Ergebnisse zeigen also weitgehend ähnliche Tendenzen wie die Zahlen Stameys und anderer oben genannter Autoren. Betont sei jedoch, daß die meisten Untersucher nur die beiden Gruppen 'gesund' und 'krank' unterschieden, wir dagegen die drei Gruppen 'gesund', 'schubfrei' und 'akuter Schub'. Während Stamey et al.(74) die zu HWI disponierten Patientinnen wiederholt untersuchten und dabei Abstrichergebnisse während und zwischen bakteriurischen Perioden in der 'kranken' Gruppe zusammenfaßten, konnten wir deutliche Unterschiede zwischen unseren drei Gruppen nachweisen.
Besonders unterstrichen sei - da von den oben genannten Autoren wenig beachtet - der von uns festgestellte deutliche Unterschied der Prävalenz von Enterokokken und gramnegativen Darmbakterien zwischen der gesunden und der schubfreien Gruppe (1/3 gegenüber 1/20 bzw. knapp 1/3 gegenüber 1/20), den wir als Zeichen einer bei den disponierten Kindern auch im schubfreien Intervall

zumindest zeitweise gegebenen erleichterten Kolonisierungsmöglichkeit für Bakterien werteten. Dem Einwand, die höhere Enterokokkenprävalenz sei ein durch den häufigen Einsatz von Cotrimoxazol bedingtes Artefakt, da Cotrimoxazol durch bessere Empfindlichkeit der gramnegativen Darmbakterien wie E.coli die Selektion von Enterokokken begünstigen könnte, kann man zwei Punkte entgegenhalten:

1. kein Kind stand zum Zeitpunkt der Untersuchung unter dem Einfluß eines Chemotherapeutikums (seit mindestens 5 Tagen)
2. die Kinder im akuten Schub wiesen eine doppelt so hohe Enterokokkenprävalenz auf, wobei Enterokokken nicht die infizierenden Erreger darstellten

Betont sei weiterhin, daß wir Enterokokkeninfektionen aus unseren Statistiken ausklammerten, was die meisten oben genannten Autoren offensichtlich nicht machten. Bei Hinzunahme der Enterokokkeninfektionen läge die Prävalenz periurethraler Enterokokken in unserer Gruppe mit akutem Schub bei 24 von 34 Fällen (knapp 3/4).

Für uns zur Zeit nicht erklärbar ist die Frage, warum sich unsere Ergebnisse mit den von Bollgren und Winberg (11,12) gefundenen Zahlen teilweise nicht decken. Da unsere Harnwegspatienten ständig zu besonderer Genitalhygiene angehalten werden, wären bei unseren Untersuchungen eher falsch negative Ergebnisse zu erwarten gewesen.

Im weiteren sei darauf hingewiesen, daß sich bei Erwachsenen und Kindern gewonnene Ergebnisse nicht unbedingt vorbehaltlos vergleichen lassen. Die chronisch rekurrierenden HWI des jungen Mädchens sind eine Art 10-Jahreskrankheit, die meist mit Beginn der Pubertät verschwindet, während beim Erwachsenen HWI zu jedem Alter auftreten können. Fraglich ist auch, inwieweit das hormonelle Milieu eine Rolle spielt - beim vorpubertären Mädchen

liegen die Östrogene in mit den bisherigen Standardmethoden nicht meßbaren Mengen vor. Sicherlich ist es also berechtigt, bei den kindlichen HWI von einem Sonderfall der chronisch rekurrierenden HWI im allgemeinen zu sprechen.

Die Bedeutung oder Ursache der unterschiedlichen Periurethralbesiedelung ist bisher ungeklärt.
Obwohl 75 - 80 % von Kleinstkindern uropathogene Keime im Periurethralabstrich aufweisen (88), entwickeln nur 1 - 3 % eine HWI. Die Zahl der Bakterien beginnt im ersten Lebensjahr abzunehmen, d.h., bevor die Kinder sauber werden (11). Im ersten Lebensjahr weisen Mädchen häufiger Klbsiella-Enterobacter auf als später, bei Knaben unter 7 Monaten dominieren E.coli, danach treten Proteus und E.coli etwa gleich häufig auf (11). Obwohl Knaben eher eine höhere Prävalenz an uropathogenen Keimen aufweisen (44), entwickeln sie nur einen Bruchteil der HWI von Mädchen. Ob hierfür möglicherweise immunologische Aspekte, etwa eine aufgrund der anatomischen Gegebenheiten mögliche lokale Immunisierung, eine Rolle spielen können, ist offen. Nach McCabe und Jackson (48) sind 66 % der HWI bei Frauen, 43 % bei Männern E.coli-Infektionen. Einige gesunde Mädchen weisen eine dichte Besiedelung auf, entwickeln aber keine Infektion.

Sicher wäre also der Schluß, daß eine dichte Besiedelung immer zur Infektion führt, falsch. Man sollte vermutlich besser diese Kolonisierung als Ausdruck einer im unteren Harntrakt vorherrschenden Abwehrschwäche auffassen, die den Bakterien Aszension und Vermehrung ermöglicht.

Im ersten Lebensjahr, vor Harn- und Stuhlkontrolle, nimmt die Besiedelung ab, was für einen sich entwickelnden Abwehrmechanismus spricht. In der ersten Lebenswoche entspricht die Periurethralflora mit wenig gramnegativen Bakterien und zahlreichen Staphylokokken einem reiferen Kolonisationsmuster, was sich durch einen mütterlichen Einfluß erklären ließe (11).
Betrachtet man die von uns festgestellte gegenüber Gesunden unterschiedliche Besiedelung auch im schubfreien Intervall, berücksichtigt man andererseits aber auch die teils langen infektionsfreien Perioden mit zum Teil 'gesundem' Besiedelungsmuster, so wäre eine sich periodisch ändernde Abwehrschwäche vorstellbar, die von Zeit zu Zeit, vielleicht auch unterstützt durch äußere Faktoren wie Baden in kaltem Wasser, einen gewissen Schwellenwert unterschreitet, was dann zum Angehen einer Infektion führt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß ein Peak der Infekthäufigkeit in den Tagen und Wochen nach einer Antibiotikakur besteht, was sich dadurch erklären ließe, daß die Bakterien durch die Chemotherapie eliminiert wurden, die Disposition aber noch besteht (12).
In diesem Falle einer wechselnden Abwehrschwäche wäre eine biochemische und biologische Untersuchung, wie wir sie durchgeführt haben, nur erfolgversprechend, wenn man Urin kurz vor Auftreten einer Infektion untersuchen würde. Nach Beginn der Infektion dürften Bakterien, Leukozyten und Entzündungsfolgen zu erheblichen Artefakten führen.

Ein weiter ungeklärtes Problem ist das von Stamey et al. (74) gefundene und jetzt von uns bei Kindern beobachtete ungleiche Auftreten von Enterokokken. Sind sie eine zufällige Begleiterscheinung einer nicht sehr spezifischen

Abwehrschwäche oder wirken sie bahnend für andere uropathogene Keime? Bollgren und Winberg (12) fanden vor Auftreten der Infektion meist eine Besiedelung durch mehrere gramnegative Spezies, trotzdem verursachte nur eine und nicht immer die häufigste die Infektion.

Der Schritt von der Beschreibung der Abwehrschwäche bis zur Klärung ihrer Ursache bereitet nun erhebliche methodische Schwierigkeiten.

Norden et al. (54) haben in den in der Einführung erwähnten Versuchen eine antibakterielle Aktivität der Schweineharnblase nachgewiesen. Da es jedoch kein Tiermodell der chronisch rekurrierenden HWI gibt, läßt sich auf diesem Weg das biochemische bzw. substantielle Substrat einer Disposition wohl nicht klären. Cox und Hinman (22) wiesen eine antibakterielle Aktivität der Harnblase bei 4 gesunden Freiwilligen nach, indem sie eine E.coli-Suspension per Katheter instillierten; hier wäre der Vergleichsversuch bei disponierten Patienten interessant, doch evtl. ohne Ergebnis, wenn sich die Abwehrschwäche zeitlich ändert. Einen besonderen Nachweis der Disposition lieferten in neuester Zeit Griffin und Salaman (37): Patienten mit Nierentransplantationen bekamen in 61 % HWI, wenn die Grundkrankheit HWI waren, in 35 % HWI, wenn andere Krankheiten zur Niereninsuffizienz geführt hatten.
Im Rahmen einer in unserem Hause durchgeführten Dissertationsarbeit konnte Metzger (50) feststellen, daß Einmalkatheterisierung von disponierten Kindern häufiger zu HWI führt als bei urologisch gesunden Kontrollen. Daß die antibakterielle Aktivität des Harntraktes vielleicht auch beim Gesunden sehr labil sein könnte, mag die Beobachtung unterstreichen, daß praktisch auch jeder urologisch gesunde Patient bei länger liegendem Dauer-

katheter eine HWI entwickelt. Nach Fuchs (32) bekommen nach 24 Stunden ca. 50 %, nach 96 Stunden fast 98 % der Patienten eine HWI.

Bei unseren Überlegungen gingen wir wie die meisten anderen Autoren von der Vorstellung aus, daß die Ursache der chronisch rekurrierenden HWI nicht in den Bakterien zu suchen ist, die praktisch bei allen Menschen physiologisch in der Darmflora auftreten, sondern in einer Veränderung im Wirtsorganismus, daß die Virulenz des Bakteriums zwar für das Angehen der Infektion notwendig ist, daß die Disposition zu ständig rekurrierenden Infektionen jedoch nur durch eine Abwehrschwäche des Wirtsorganismus erklärbar ist.

Mit unseren biochemischen und biologischen Untersuchungen hofften wir durch Feststellung eines Unterschiedes zwischen Gesunden und Kranken einen Einstieg in die Klärung dieser Veränderungen zu finden.

Im wesentlichen wären drei Erklärungsmodelle denkbar:

1. Im Urin normaler Personen ist eine antibakterielle Substanz vorhanden, die die Elimination einzelner in den Harntrakt gelangender Bakterien begünstigt. Vorstellbar wäre ein hochmolekulares Protein, das sich kompetitiv zu den Zellrezeptoren an die Bakterien bindet und dadurch das Angehen einer Infektion in der Harnblase verhindert.
2. Bei Kranken liegt eine Substanz vor, die die normal vorhandene antibakterielle Aktivität hemmt, bzw. das Bakterienwachstum begünstigt.
3. Das Harntraktsübergangsepithel ist sterisch, elektrostatisch oder biochemisch bei Disponierten so verändert, daß eine Infektion erleichtert wird.

Auch im 3. Fall bestünde die Chance, daß im Rahmen des natürlichen Turnover abgeschilferte veränderte Glykokalixbestandteile der Harnwegsepithelien als Unterschied im Muster der Urinbestandteile zwischen Gesunden und Kranken erkennbar und nachweisbar wären.

Das Übergangsepithel des Harntraktes enthält, wie einige biochemische Arbeiten bestätigen (17), komplexe Zuckerbestandteile, Glykoproteine und bemerkenswert viel Sialsäure. Daraus läßt sich vermuten, daß die Glykokalix die Quelle bestimmter Uringlykoproteine ist, wie des Tamm-Horsfall-Glykoproteins (29,53,83,84), dessen Bedeutung noch weitgehend ungeklärt ist. Unter diesen, im Harntrakt sezernierten Glykoproteinen wäre auch eine antibakterielle Substanz im Sinne der Gibbons'schen Speichelglykoproteine (87) denkbar. Auch eine elektrostatische Abstoßung zwischen negativ geladener Bakterienkapsel und negativ geladener hydrophiler Oberflächenstruktur des Harntrakts, wie sie Edebo et al. (23) vermuten, könnte Grundprinzip einer funktionierenden Abwehr sein.

Hauptproblem einer biochemischen Vergleichsuntersuchung der Urinbestandteile von Gesunden und Kranken dürfte die Unterscheidung zwischen physiologischen Tagesschwankungen, die teils bis über 50 % betragen können (4,40), und pathologischen Veränderungen sein. Als verdächtig dürfte man also nur bei Gesunden und Kranken klar unterschiedliche Befunde auffassen. Im Falle eines Unterschiedes sollte dieser in einem biologischen Test bestätigt werden.

Durch Verwendung von 2 x 24 = 48 Std.-Urin versuchten wir, die Tagesschwankungen zu reduzieren.

Die uns in besonderem Maße interessierenden hochmolekularen

Urinsubstanzen mußten sich im ersten Sephadex G 50 sf - Peak (G 50/1) befinden - wir bestimmten sein Molekulargewicht als etwa über 10^4 liegend -; deshalb untersuchten wir in erster Linie diesen Peak. Von dem Sephadex G 50 sf - Zwischenstück (G 50/2, Molekulargewicht etwa 5000 - 10000) bestimmten wir wie bei G 50/1 die N-terminalen Aminosäuren und führten einen in-vitro-Attachment-Test durch; die übrigen Bestimmungen beschränkten wir jedoch auf G 50/1. Der zweite, braune Sephadex G 50 sf-Peak (G 50/3) mit Molekulargewichten unter 5000 wurde verworfen.

Bei den N-terminalen Aminosäurebestimmungen von G 50/1 zeigte sich eine erhebliche Heterogenität und auch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kindern, die jedoch wegen fehlender klar unterschiedlicher Tendenzen zwischen den Gesunden und Kranken keine sichere Aussage zulassen. Entwertet wird die Methode etwas durch die Tatsache, daß am N-terminalen Ende der Immunglobuline der variable Teil liegt (20), doch dürfte dieser Umstand bei dem geringen Immunglobulingehalt des Urins (max. 3 - 4 mg/24 Std. (8,40)), der sich zusätzlich auf verschiedene Aminosäurefraktionen verteilt, nicht allzusehr ins Gewicht fallen. Notwendig wäre ein biologischer Test, der eventuelle Unterschiede bestätigt, worauf man mit biochemischen Trennmethoden weiter einengen könnte und von den Unterfraktionen wieder die N-terminalen Aminosäurefraktionen vergleichen könnte. Im weiteren wäre denkbar, daß eine biologisch wirksame, entscheidende Substanz in sehr kleiner, von anderen Substanzen mit derselben N-terminalen Aminosäure verdeckter Menge vorliegen könnte und ein Ergebnis dadurch verloren gehen könnte. Diese Möglichkeit konnten wir dadurch weitgehend ausschließen, daß wir auch die Muster der nächstletzten

Aminosäuren bestimmten. Doch auch hier zeigten sich Unterschiede, aber keine klaren, ohne Zusatzinformation verwertbaren Tendenzen.
Ebenfalls Unterschiede, aber keine klaren Tendenzen zeigten die N-terminalen Aminosäurebestimmungen von G 50/2.

Elektrophoretisch haben bereits Boesken (9) und Boesken et al. (10) die Urinproteine untersucht. Ihre Fragestellung waren jedoch die Differenzierung von Krankheiten mit Proteinurie anhand des Urinproteinmusters. Insofern wurde weniger auf primär vorhandene, hochmolekulare, im Harntrakt sezernierte Proteine geachtet, als auf durch Niereninsuffizienz filtrierte Blutproteine. Bei niereninsuffizienten erwachsenen Patienten mit chronischer Pyelonephritis wurde ein bestimmtes tubuläres Muster gefunden, das auch bei Kontrolluntersuchungen kaum Veränderungen zeigte. Zu den untersuchten Kindern mit Pyelonephritis schreibt Boesken (9): "Bei Kindern mit rezidivierender Pyelonephritis meist kürzerer Verlaufszeit war dieses tubuläre Muster oft nicht eindeutig ausgeprägt." Hierzu ist zu bemerken, daß diese Kinder wohl nur am Rande mituntersucht wurden. Für unsere Fragestellung interessiert auch das tubuläre Muster höchstens in zweiter Linie, da die Infektion ihren Ausgang von der Urethra und Blase nimmt und erst sekundär die Niere erfaßt, eine veränderte Filtration also nur Folge der HWI ist; von Bedeutung für uns sind vor allem unterhalb der Blut-Nierengrenze sezernierte oder abgeschilferte Substanzen. Außerdem wäre zu sagen, daß eine Einschränkung der Nierenfunktion beim Kind mit chronisch rekurrierenden HWI nur während des akuten Schubs besteht. Im schubfreien Intervall sind, wie an unserem Krankengut festgestellt wurde (86), Osmolalität und Isotopennephrogramme praktisch unauffällig, so daß man wohl weitgehend

normal arbeitende Nieren voraussetzen kann. Insofern wäre bei unseren Kindern kein besonderes tubuläres Muster zu erwarten.
Für unsere Elektrophoresen wählten wir die Bedingungen so, daß vor allem Molekülgrößen von 30000 bis 200000 zur Darstellung kamen. Es stellte sich jedoch ein derartiges quantitatives Dominieren der Moleküle unter MG 70000 heraus, daß die höhermolekularen Substanzen nur noch in nicht mehr anfärbbaren Mengen erschienen. Leider war aus technischen Gründen eine Wiederholung der Läufe nicht möglich, ebensowenig eine photometrische quantitative Bestimmung der angefärbten Banden.
Bei näherer Betrachtung scheint das Verhältnis der niedermolekularen Banden (MG ca. 20000 bis 40000) zu den höhermolekularen Banden (MG ca. 70000) bei den Kranken zugunsten der niedermolekularen verschoben zu sein.
Wir hatten versucht, in allen Fällen möglichst gleiche Auftragsmengen zu benützen, was in Anbetracht der starken Hygroskopizität jedoch erhebliche Schwierigkeiten bereitet.

Ungeklärt, aber möglicherweise von erheblicher Bedeutung ist die Rolle der Sialsäuren im ableitenden Harnsystem. So wird in dem Übersichtsartikel von Holmgren und Smith (41) über immunologische Aspekte bei HWI die Möglichkeit diskutiert, daß die Abwehrmechanismen auch durch die negative elektrische Ladung an der Bakterienoberfläche erklärt werden könnten. Die hydrophilen O-Antigen-Seitenketten und die E.coli-Kapsel würden den Kontakt mit den Wirtszellen verhindern, die auch negativ geladene hydrophile Oberflächenstrukturen tragen, darunter Sialsäure. Dies könnte zwar einerseits die Phagozyten in der Niere daran hindern, die Bakterien zu verschlingen, ebensogut aber auch der Grund für die antibakterielle

Aktivität der Harnblase sein (54). Norden, Green und Kass hatten als Erklärung für die von ihnen beobachtete antibakterielle Aktivität der Harnblase eventuell eine bisher nicht definierte antibakterielle Substanz auf der Blasenmukosa gefordert, vielleicht eine organische Säure, die in der intakten Blase ständig nachproduziert wird und eine begrenzte Kapazität hat. Wie bereits erwähnt, ist das Harntraktsübergangsepithel bemerkenswert reich an Sialsäure (17). Enzymatische Abspaltung von Sialsäure in Schweineharnblasen führte zu wesentlich verstärktem Attachment von gramnegativen Darmbakterien, d.h. der Oberflächenkontakt wurde dadurch verbessert (82). In ähnlicher Weise verbesserte Sialidasebehandlung auch die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen (2). Weiterhin ist bekannt, daß bei bestimmten biologisch aktiven Glykoproteinen wie z.B. Gonadotropinen oder Erythropoietin die Aktivität weitgehend von ihrem Gehalt an Sialsäure abhängt (17,35). Biochemische Sialsäureabtrennung führte bei FSH zu einem Aktivitätsverlust von 97 % (35). Außerdem gibt es Anzeichen, daß Sialsäuren die räumliche Struktur der Proteine weitgehend mitbestimmt (65). Theoretisch wäre also durch die Sialidasebehandlung eine Veränderung der Struktur und dadurch eine Veränderung des interzellulären Kontaktes zwischen Bakterium und Epithelzelle bzw. Glykoprotein vorstellbar.

Wir führten bei unseren Vergleichsuntersuchungen sowohl Bestimmungen der freien Sialsäure in Nativurin durch, als auch quantitative Bestimmungen des gebundenen Sialsäureanteils von G 50/1.
Die Untersuchungen der freien Sialsäure in Nativurin bei gesunden und kranken Mädchen brachen wir nach etwa 100 Bestimmungen wieder ab, da die Werte sehr stark streuten (12 - 42 µg/ml) und sich in den verschiedenen Gruppen

zum größten Teil überlappten. Die Durchschnittswerte der schubfreien HWI-Mädchen lagen wohl etwas unter denen der gesunden Gruppe, doch lagen die Werte der Kinder mit akutem Schub im selben Bereich wie die der gesunden. Von 3 Mädchen in der schubfreien Gruppe, die besonders niedrige Werte aufwiesen, hatten zwei nach 2 Wochen eine HWI entwickelt, was in Anbetracht der erheblichen Schwankungen allerdings auch Zufall sein könnte. Bei unseren quantitativen Vergleichstests der gebundenen Sialsäuren von G 50/1 ergaben sich Werte von etwa 100 µg Sialsäure pro mg Substanz ohne unterschiedliche Tendenzen zwischen Gesunden und Kranken. Dieses Ergebnis widersprach nicht unseren Erwartungen. Bei einer Heterogenität von bis zu 50 verschiedenen Proteinfraktionen (13), die auch wir N-terminalanalytisch zeigen konnten, von denen viele Sialsäure enthalten, müßten sehr deutliche Unterschiede bestehen, wenn sich in dem globalen Sialsäuretest klar verschiedene Tendenzen zeigen sollten. Deshalb ist auch geplant, nach der Vervollkommnung und weiteren Ausarbeitung unseres in-vitro-Attachment-Tests die attachmentbeeinflussende Wirkung der Uringlykoproteine vor und nach Sialidasebehandlung zu vergleichen. Wenn eine biologische Wirkung an die Gegenwart von Sialsäure gebunden sein sollte, müßte sich nach Abspaltung ein Unterschied zeigen, auch wenn die entscheidende Substanz nur in minimalen Mengen auftreten würde.

In einer 1977 erschienenen Arbeit haben Salit und Gotschlich (59) eine attachmenthemmende Wirkung bestimmter Zucker beschrieben. D-Mannose und Analoge wie α-D-Methylmannosid hemmen das Attachment von E.coli-Pili an Affennierenzellen. Aus dieser Beobachtung wird der Schluß gezogen, daß sich E.coli bevorzugt an mannosehaltige Glykoproteine an Säugerzelloberflächen binden. Nebenbei

wird auch von diesen Autoren festgestellt, daß Sialidase-behandlung das Attachment begünstigt.

Als therapeutische Konsequenz derartiger Ergebnisse wäre u.U. die Gabe eines über die Niere ausgeschiedenen, nicht verstoffwechselten Zuckers denkbar.
Allerdings erschien 1978 eine Arbeit von Svanborg Edén und Hansson (79), in der eine attachmentbeeinflussende Wirkung derartiger Zucker abgelehnt wird. Zwar hemmten D-Mannose und α-Methyl-D-Mannopyranosid die Hämagglutination von Meerschweinchenerythrozyten, doch wurde kein hemmender Effekt auf das Attachment von E.coli-Stämmen mit Pili an Harntraktsepithelzellen durch D-Mannose, α-Methyl-D-Mannopyranosid, D-Galaktose oder 6-Deoxy-L-Galaktose gefunden.
Wir haben bei einem kranken Mädchen mit besonders häufigen HWI und bei gepooltem gesunden Urin vergleichende Zuckeranalysen von G 50/1 durchgeführt und dabei neben Fucose, Galaktose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Galaktosamin auch Mannose gefunden; größere quantitative Unterschiede in der Zuckerverteilung bestehen jedoch nicht.

Mit unseren in-vitro-Attachment-Untersuchungen wollten wir der Frage nachgehen, ob evtl. frei im Urin befindliche Substanzen, insbesondere Glykoproteine eine attachmentbeeinflussende Aktivität haben könnten.
So ist bekannt, daß Glykoproteine auf menschlichen Zelloberflächen als Rezeptoren für das Attachment von Influenzaviren (1,64), Myxoviren und Mykoplasmen fungieren. Ähnliche Verhältnisse scheinen am Wangenepithel für das Attachment von Streptokokken zu bestehen. Wie oben mehrfach angeführt, wurde in verschiedenen Arbeiten (27,34,42,87) nachgewiesen, daß neben den

sekretorischen IgA-Antikörpern im Mund vor allem Glykoproteine für die antibakterielle Wirkung maßgebend sind, die antigenetisch den Oberflächenstrukturen der Wangenepithelzellen sehr ähnlich sind und so durch kompetitive Bindung an Bakterien oder auch Maskierung der Wangenepithelrezeptoren das Bakterienattachment vermindern und außerdem die Desorption bereits anhaftender Bakterien erleichtern.

Die Möglichkeit, daß bei Patienten eine Substanz vorliegt, die das Bakterienwachstum begünstigt, wurde erstmals von Taylor (85) 1972 beschrieben. Er identifizierte eine antibakterizide Substanz im Serum von HWI-Patienten als IgG. Ausgangspunkt war seine Beobachtung, daß bei einigen Patienten Infektionen des oberen Harntraktes durch Darmbakterien verursacht worden waren, die empfindlich gegenüber Normalserum, aber nicht gegenüber die eigenen Seren der Patienten waren. Auch Guttman und Waisbren (38) identifizierten einen gegenüber chronischen Pseudomonas aeruginosa - Infektionen antibakteriziden Faktor als IgG. 1976 gingen Miller et al. (51) diesem 'Enhancement' genannten Effekt im Tierversuch nach: Tiere mit experimenteller Pyelonephritis, die mit Cyclophosphamid behandelt wurden, produzierten keine antibakteriellen Antikörper, eliminierten aber die Mikroorganismen schneller als unbehandelte Kontrolltiere mit intakter Immunabwehr. Die Autoren erklärten diesen Effekt durch immunologisches Enhancement.

Wir testeten die attachmentbeeinflussende Wirkung von G 50/1 und G 50/2, sowie der durch Con A-Sepharose aufgetrennten beiden Unterfraktionen von G 50/1, Con A 1 und Con A 2.
Durch die erhebliche Schwankungsbreite unserer Attachmentzahlen ist eine Interpretation allerdings sehr erschwert.

Der Vergleich der Mittelwerte der Attachmentzahlen nach Zugabe von G 50/1 - Substanz zeigt meist ein stärkeres bakterielles Attachment bei den Kranken als bei den Gesunden. Dieser Unterschied wird noch etwas deutlicher bei der Betrachtung der Attachmentzahlen nach Zugabe von Substanzen von Con A 1 und Con A 2, die Teilmengen der G 50/1 - Substanz darstellen. Wegen der geringen Fallzahl ist die Signifikanz dieses Unterschiedes jedoch unsicher. Wir werden dieser Frage weiter nachgehen.

Der Attachment-Test ist mit einer Reihe von Fehlermöglichkeiten behaftet, die sich komplett nicht eliminieren lassen:
Der Test verspricht nur ein Ergebnis, wenn eine aktive freischwimmende Substanz vorliegt, die durch den Aufbereitungsprozeß nicht zerstört wurde, und wenn das Attachment relativ unspezifisch verläuft. Da der Test nur mit einem gut klebenden E.coli-Stamm durchführbar ist, der meist keine HWI verursacht, wäre es vorstellbar, daß keine genügende antigenetische Ähnlichkeit zwischen Bakterium und etwaigem antibakteriellen Glykoprotein besteht und dadurch ein falsch negatives Ergebnis entstehen könnte.
Um eine gewisse Standardisierung zu erreichen, haben wir die Harnepithelien immer von derselben (gesunden) Spenderin benützt. Da die ausgeschiedene Menge begrenzt ist, ist es unvermeidbar, daß Zellen von verschiedenen Urinproben benützt und verglichen werden und dadurch evtl. Tagesschwankungen eine größere Rolle spielen könnten, was jedoch nach Svanborg Edén et al. (76) nur eine Attachmentbeeinflussung um 3 % bewirkt.
Auch aus dem Umstand, daß die Harnepithelien aus verschiedenen Bereichen des Harntraktes stammen,

könnte man unterschiedliche Attachmentzahlen erwarten; nach Svanborg Edén et al. (76) liegen die dadurch bedingten Schwankungen ebenfalls in einem Bereich von nur etwa 3 %, weshalb man diese Fehlerquelle wohl vernachlässigen kann.
Da die Bakterienzählung unter dem Mikroskop bei einer Bakterienzahl von etwa 30 bis 50 pro Zelle und 40 auszuzählenden Zellen pro Fall zeitaufwendig ist und immer von derselben Person durchgeführt werden sollte, um den subjektiven Zählfehler möglichst gering zu halten, kann man nicht alle 8 Parallelbestimmungen in einem Arbeitsgang durchführen. Durch Aufbewahren im Kühlschrank dürften die Zellen jedoch ebenso eine Veränderung erfahren wie durch Einfrieren und Auftauen.
Schließlich kommt noch ein weiterer Störfaktor dadurch zustande, daß nach Inkubation der Bakterien und Zellen die freischwimmenden Bakterien entfernt werden müssen. Wäscht man zu oft, werden an Zellen adhärierende Bakterien evtl. gelöst, wäscht man zu selten, bleiben viele Bakterien in der Lösung und verfälschen das Zählergebnis. Wir versuchten diesen Fehler zu reduzieren durch Zugabe von Glutardialdehyd, der freischwimmende Bakterien inaktivieren soll.

Daß ein derartiger Test eine höhere Fallzahl als 2 x 4 Testpersonen erfordern würde, ist uns bewußt; die aufwendige Urinpräparation war jedoch bei mehr Personen aus technischen Gründen nicht möglich.

Die Gruppe um Svanborg Edén (75 - 80) hat vor kurzem in großem Umfang mit Attachmentuntersuchungen im harnablei-

tenden System begonnen. Sie entwickelten den von uns übernommenen Attachment-Test und führten durch Untersuchung des Einflusses von E.coli-Stamm, Epithelzellen, Bakteriennährböden, Wachstumsphase, Zahl, Inkubationszeit und Temperatur, sowie pH und Osmolalität eine Optimierung der Testbedingungen herbei. Außerdem wurde der Einfluß von sekretorischem IgA und einiger Zucker getestet (75,78,79, 80).

Bei vergleichenden Untersuchungen des Attachments von E.coli-Stämmen von akuten Pyelonephritiden, akuten Cystitiden, asymptomatischen Bakteriurien und aus dem Stuhl von gesunden Probanden an Epithelzellen einer gesunden Spenderin nahm die Bakterienzahl in der Reihe Pyelonephritis - Cystitis - asymptomatische Bakteriurie - gesund signifikant ab (75,77,78).

Ein für unsere Fragestellung hochinteressanter Befund wurde von Svanborg Edén 1978 veröffentlicht (75): Bei einem Vergleich des Attachments an Epithelzellen von Gesunden und Patienten mit rekurrierenden HWI und dabei die infizierenden E.coli-Stämme der Kranken benützend zeigte sich ein signifikant höheres Attachment bei den Kranken. Genauere Angaben insbesondere über den Zeitpunkt der Epithelzellentnahme - während einer akuten Infektion dürften die Epithelzellen bereits im Urin mit Bakterien beladen sein - oder über den Grund für die Benutzung der infizierenden Spezies - ob etwa bei der Wahl eines anderen E.coli-Stammes kein Unterschied festgestellt werden konnte - sind in dem Artikel nicht aufgeführt. Weiterhin wird von dieser Autorengruppe eine attachmenthemmende Wirkung von Immunglobulinen festgestellt: Bei Zugabe von kommerziellem Gammaglobulin oder der Immunglobulinfraktion von menschlicher Frauenmilch nimmt das Attachment deutlich ab (75,80); ebenfalls hemmend wirken sekretorisches IgA und IgG, das aus dem

Urin von Patienten mit akuter Pyelonephritis gewonnen wurde (75,78,80). Ein Defekt der lokalen Immunantwort scheint nicht vorzuliegen, da schon am dritten Tag der Infektion von Hanson et al. (39) Antikörper gegen das O-Antigen des infizierenden E.coli-Stammes im Urin nachgewiesen wurden. Der höchste Antikörperspiegel wird nach etwa 10 Tagen erreicht (62).
Wahrscheinlich ist hier der Grund zu suchen, daß 70 - 85 % der Reinfektionen von verschiedenen Erregern, bzw. anderen E.coli-Serotypen ausgehen (7).
An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, daß die immer wieder geforderte humorale Abwehrschwäche unwahrscheinlich ist. In Anbetracht der großen Vielfalt verschiedener Bakterienarten und Serotypen ist die Bedeutung eines solchen hochspezifischen Abwehrmechanismus sehr unsicher. Wie oben angeführt, scheint auch die lokale Immunantwort bei Patienten intakt zu sein (39,62). Vorstellbar wäre nach unserer Auffassung höchstens eine relativ unspezifische IgA-Abwehrfunktion gegen bei vielen Bakterienstämmen gemeinsam auftretende Bestandteile wie etwa die Endotoxinkomponente Lipid A, doch liegen hierüber keinerlei Untersuchungen vor.
Die genannten vielseitigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Svanborg Edén, besonders aber die unterschiedlichen Attachmentzahlen an Epithelzellen von Gesunden und Kranken (75), nicht zuletzt auch unsere eigenen Attachmentuntersuchungen sprechen auch gegen die teilweise diskutierte Möglichkeit der Disposition durch radiologisch nicht erfaßbare Minimalurethralstenosen, dadurch bedingte Wirbelbildungen, Epithelschädigungen und erleichtertes Angehen der Infektionen. Der direkte Ausschluß dieser Möglichkeit durch Bougierung kam für uns im Rahmen dieser Arbeit nicht in Frage.

Durch unsere vergleichenden Untersuchungen der Periurethralflora von gesunden, schubfreien und akut kranken Mädchen konnten deutliche Unterschiede zwischen den drei Gruppen gezeigt werden. Da die schubfreie Gruppe in je einem Drittel der Fälle Enterokokken und gramnegative Darmbakterien aufweist, die bei Gesunden fast nie auftreten, ist bei disponierten Mädchen eine zumindest zeitweise gestörte Abwehrsituation in dieser Region anzunehmen, wobei noch nicht geklärt ist, ob dadurch der Bakterienaufstieg ermöglicht wird, oder ob die Periurethralkolonisierung nur sichtbarer Ausdruck einer Abwehrschwäche im gesamten unteren Harntrakt ist.

Durch unsere biochemischen Untersuchungen konnten wir einen groben Eindruck über die Zusammensetzung des menschlichen Urins im höhermolekularen Bereich, insbesondere über die Sialsäureverteilung gewinnen.
Unter den von uns getesteten biochemischen Säulentrennmethoden eignen sich Sephadex G 50 sf, Con A - Sepharose und Sepharose 4 b zur Abtrennung und weiteren Auftrennung der hochmolekularen Urinbestandteile.
Die biochemischen Vergleichsuntersuchungen sind durch die Heterogenität und die starken Tagesschwankungen erheblich erschwert, so daß ein empfindlicher biologischer Test Voraussetzung für die Fortführung der biochemischen Untersuchungen zu sein scheint, da nur auf diesem Weg eine Interpretation geringer biochemischer Unterschiede möglich wird. Deutliche biochemische Unterschiede konnten wir nicht nachweisen.

Mit dem von Svanborg Edén et al. (75,76,78) entwickelten Attachment-Test ist uns eine vielseitig variierbare

Möglichkeit gegeben, den Schlüsselvorgang für die Infektion, das Anhaften des Bakteriums an der Harntraktsepithelzelle zu studieren. Hier konnten wir durch Zugabe von hochmolekularen Urinsubstanzen von Gesunden und Kranken in diesem ersten Versuch eine Tendenz zu verstärktem Attachment bei Kranken feststellen. Da die Bakterienzahlen der Kranken meist über dem Leerwert liegen, würde dies für einen bakterienbegünstigenden Faktor bei disponierten Patienten sprechen. Unsere Fallzahl ist jedoch sehr gering, die Signifikanz unsicher.

Im weiteren wird es notwendig sein, die aufgezeigten experimentellen Vorgehensweisen zu vervollkommnen und weiterzuverfolgen.

Gerade in jüngsten Veröffentlichungen (94) wird auf die Bedeutung des Attachments für das Angehen einer Infektion und die Rolle der Rezeptoroberflächenstrukturen hingewiesen. Neue Ergebnisse über die Funktion von Glykoproteinen bei zellulären Interaktionen und biologischen Prozessen wurden vor kurzem von der Gruppe um Köttgen und Gerok (91,92,93) vorgelegt.

Wir glauben, daß uns mit den durchgeführten Tests und Trennmethoden Möglichkeiten zur Verfügung stehen, einen weiteren Schritt zur Klärung von Problemen wie Attachment, Bedeutung unspezifischer immunologischer Faktoren, Rolle der Glykoproteine und Sialsäuren voranzukommen und der Klärung der Pathogenese der chronisch rekurrierenden HWI näherzukommen.

6. Zusammenfassung

Bei zunehmender Vermutung eines aszendierenden Infektionsweges bei Harnwegsinfektionen und Fehlen jeglicher nachweisbarer Abnormitäten in der allgemeinen Infektabwehr rückt die Bedeutung der lokalen Abwehrsituation immer mehr in den Mittelpunkt der Diskussion über die Pathogenese der chronisch rekurrierenden Harnwegsinfektionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst bei etwa 100 Mädchen im Alter zwischen 5 Jahren und Menarche an den 3 Gruppen gesund - schubfrei - akuter Schub von chronisch rekurrierenden Harnwegsinfektionen die aerobe Periurethralflora qualitativ und quantitativ vergleichend untersucht. Als Hauptergebnis nahm die Enterokokkenprävalenz in der genannten Reihenfolge mit 1/20, 1/3 und 2/3 bzw. die Prävalenz gramnegativer Darmbakterien mit 1/20, knapp 1/3 (10/36) und 100 % zu. Besonders die im Vergleich zu Gesunden häufigere Kolonisierung der Patientinnen im Intervall wurde als Folge einer zumindest zeitweise vorhandenen lokalen Abwehrschwäche gedeutet.

Als Konsequenz dieser Beobachtung wurden mit biochemischen Methoden die hochmolekularen Bestandteile von dialysiertem Urin Gesunder und Schubfreier auf Unterschiede verglichen und in einem in-vitro-Test ihr Einfluß auf das Attachmentverhalten von E.coli an Harnepithelien untersucht, wobei als Denkmodell der Abwehrschwäche das Fehlen einer antibakteriellen oder vermehrte Auftreten einer bakterienbegünstigenden freischwimmenden Substanz oder eine Veränderung der Zelloberflächenstrukturen im harnableitenden System, etwa der Sialsäuren, vorstellbar wäre.

Die Abtrennung der hochmolekularen Urinsubstanzen (etwa

über MG 10^4) wurde mit Gelchromatographie an Sephadex G 50 sf durchgeführt, zur weiteren Auftrennung eignet sich Concanavalin A - konjugierte Sepharose oder Sepharose 4 b.

Zur groben biochemischen Charakterisierung wurden die Einzelfraktionen einer Sephadex G 50 sf - Chromatographie auf Protein-, Zucker-, Elektrolyt- und Sialsäureverteilung geprüft. Eine erhebliche Heterogenität der Urinproteine wurde durch N-terminale Aminosäureanalysen festgestellt.

Zwischen den hochmolekularen Urinsubstanzen der Gesunden und Schubfreien zeigten sich N-terminalanalytisch und SDS-gelelektrophoretisch gewisse Unterschiede, die jedoch keine sichere Interpretation zulassen. Der Sialsäuregehalt war gleich, ebenso die Zuckerverteilung. Möglicherweise attachmenthemmende Mannose war in beiden Gruppen enthalten.

In einem Attachment-Test stellten wir ein etwas stärkeres bakterielles Attachment bei Zugabe hochmolekularer Urinsubstanzen von Kranken im Vergleich zu Gesunden fest: bei mehreren Bestimmungen lagen die Mittelwerte der an Harntraktepithelzellen einer gesunden Spenderin adhärierenden Bakterien meist etwas höher, wenn Material des ersten (hochmolekularen) Sephadex G 50 sf - Bereichs Kranker dazugegeben wurde, als entsprechendes Material Gesunder. Dieser Unterschied war noch etwas deutlicher bei Zugabe von Material der über Concanavalin A - Sepharose aufgetrennten Sephadex G 50 sf - Teilbereiche. In Anbetracht der geringen Fallzahl und der großen Streubreite ist die Signifikanz dieses Ergebnisses jedoch unsicher.

Für weitere biochemische Vergleichsuntersuchungen ist wegen der erheblichen Heterogenität der Urinbestandteile ein empfindlicher biologischer Test Voraussetzung. Vor der Fortführung der Untersuchungen muß geklärt werden, ob die Abwehrschwäche ständig besteht oder sich periodisch ändert, da dies bei der Materialgewinnung berücksichtigt werden müßte.

7. Literatur

1. Ada,G.L.,Stone,J.D.:
Electrophoretic studies of virus - red cell interaction: mobility gradient of cells treated with viruses of influenza group and receptor-destroying enzyme of V.cholerae.
Brit.J.exp.Path. 31:263-274,1950

2. Allen,J.M.,Cook,G.M.W.:
A study of the attachment phase of phagocytosis by murine macrophages.
Exp.Cell Res. 59:105-116,1970

3. Aminoff,D.:
Methods for the quantitative estimation of N-Acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids.
Biochem.J. 81:384-392,1961

4. Anderson,A.J.,Maclagan,N.F.:
The isolation and estimation of urinary mucoproteins.
Bioch. 59:638-644,1955

5. Asscher,A.W.,Sussman,M.,Waters,W.E.,Davis,R.H., Chick,S.:
Urine as a medium for bacterial growth.
Lancet 1037-1041,1966

6. Bailey,R.R.,Gower,P.E.,Roberts,A.P.,Stacey,G.:
Urinary-tract infection in non-pregnant women.
Lancet 275-277,1973

7. Bergström,T.,Lincoln,K.,Ørskov,F.,Ørskov,I., Winberg,J.:
Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. VIII. Reinfection vs. relapse in recurrent urinary tract infections. Evaluation by means of identification of infecting organisms.
J.Pediat. 71,1:13-20,1967

8. Bienenstock,J.,Tomasi,T.B.:
Secretory IgA in normal urine.
J.clin.Invest. 47:1162-1171,1968

9. Boesken,W.H.:
Die tubuläre Proteinurie.
Klin.Wschr. 53:473-479,1975

10. Boesken,W.H.,Kopf,K.,Schollmeyer,P.:
Differentiation of proteinuric diseases by discelectrophoretic molecular weight analysis of urinary proteins.
Clin.Nephrol. 1,5:311-318,1973

11. Bollgren,I.,Winberg,J.:
The periurethral aerobic bacterial flora in healthy boys and girls.
Acta paediat.scand. 65:74-80,1976

12. Bollgren,I.,Winberg,J.:
The periurethral aerobic flora in girls highly susceptible to urinary infections.
Acta paediat.scand. 65:81-87,1976

13. Bourrillon,R.:
Urinary glycoproteins, glycopeptides and related heterosaccharides. In: Gottschalk,A.: Glycoproteins. Their composition, structure and function. Part B.
B.B.A. Library Vol.5,1972

14. Bourrillon,R.,Cornillot,P.,Michon,J.,Got,R.:
Chromatographie sur DEAE-cellulose des protéines urinaires précipitables par l'éthanol á 50 %.
Clin.chim.Acta 8:513-521,1963

15. Bruce,A.W.,Chadwick,P.,Hassan,A.,VanCott,G.F.:
Recurrent urethritis in women.
C.M.A.Journal 108:973-976,1973

16. Burdon,D.W.:
Immunoglobulins of normal human urine and urethral secretions.
Immunology 21:363-368,1971

17. Candiotti,A.,Ibañez,N.,Monis,B.:
Carbohydrate content of transitional epithelium of the urinary system.
Experientia 27:551-552,1971

18. Cattel,W.R.,McSherry,M.A.,Northeast,A.,Powell,E., Brooks,H.J.L.,O'Grady,F.:
Periurethral enterobacterial carriage in pathogenesis of recurrent urinary infection.
Brit.med.J. 4:136-139,1974

19. Chernew,I.,Braude,A.I.:
Depression of phagocytosis by solutes in concentrations found in the kidney and urine.
J.clin.Invest. 41:1945-1953,1962

20. Clamp,J.R.,Johnson,I.:
Immunoglobulins. In: Gottschalk,A.:
Glycoproteins. Their composition, structure
and function. Part A.
B.B.A. Library Vol.5, 1972

21. Cox,C.E.:
The urethra and its relationship to urinary
tract infection: The flora of the normal
female urethra.
South.med.J. 59:621-626,1966

22. Cox,C.E.,Hinman,F.:
Experiments with induced bacteriuria, vesical
emptying and bacterial growth on the mechanism
of bladder defense to infection.
J.Urol. 86:739-748,1961

23. Edebo,L.,Stendahl,O.,Tagesson,C.:
Mekanismer i interaktionen mellan enterobakterier
och animalceller.
Lakartidningen 70:1874,1973

24. Edman,P.:
Sequence Determination.
In: Protein Sequence Determination.
Needleman,S.B.,ed.,1st edn. 211-335,1970

25. Edman,P.,Begg,G.:
A protein sequenator.
Eur.J.Biochem. 1:80-91,1967

26. Elkins,I.B.,Cox,C.E.:
Perineal, vaginal and urethral bacteriology of
young women. I. Incidence of gram-negative
colonization.
J.Urol. 111:88-92,1974

27. Ellen,R.P.,Gibbons,R.J.:
Parameters affecting the adherence and tissue
tropisms of streptococcus pyogenes.
Infect.and Immun. 9:85-91,1974

28. Fair,W.R.,Timothy,M.M.,Millar,M.A.,Stamey,T.A.:
Bacteriologic and hormonal observations of the
urethra and vaginal vestibule in normal,
premenopausal women.
J.Urol. 104:426-431,1970

29. Fletcher,A.P.:
The Tamm and Horsfall glycoprotein.
In: Gottschalk,A.: Glycoproteins. Their
composition, structure and function. Part B.
B.B.A. Library Vol.5, 1972

30. Fowler,J.E.,Latta,R.,Stamey,T.E.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VIII. The role of bacterial interference.
J.Urol. 118:296-298,1977

31. Fowler,J.E.,Stamey,T.E.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence.
J.Urol. 117:472-476,1977

32. Fuchs,T.:
Pyelonephritis, Diagnostik und Therapie.
Boehringer Mannheim GmbH,1969

33. Furthmayr,H.,Timpl,R.:
Characterization of collagen peptids by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis.
Anal.Biochem. 41:510-516,1971

34. Gibbons,R.J.,van Houte,J.:
Bacterial adherence in oral microbial ecology.
Ann.Rev.Microbiol. 29:19-44,1975

35. Gottschalk,A.,Whitten,W.K.,Graham,E.R.B.:
Inactivation of follicle-stimulating hormone by enzymic release of sialic acid.
Biochim.biophys.Acta 38:183-184,1960

36. Grant,A.M.S.,Baker,L.R.I.,Neuberger,A.:
Urinary Tamm-Horsfall glycoprotein in certain kidney diseases and its content in renal and bladder calculi.
Clin.Science 44:377-384,1973

37. Griffin,P.J.A.,Salaman,J.R.:
Urinary tract infections after renal transplantation: Do they matter?
Brit.med.J. 1:710-711,1979

38. Guttman,R.M.,Waisbren,B.A.:
Bacterial blocking activity of specific IgG in chronic Pseudomonas aeruginosa infection.
Clin.exp.Immunol. 19:121-130,1975

39. Hanson,L.A.,Holmgren,J.,Jodal,U.,Kaijser,B.,
Lönnroth,I.,Wadsworth,C.:
Immunoglobulins in urines of children with urinary tract infections.
In: The secretory immunologic system.
(ed.) D.H.Dayton.pp.367-383. U.S.Government Printing Office, Washington,D.C.,1971

40. Hemmingsen,I.,Skaarup,P.:
The 24-hour excretion of plasma proteins in the urine of apparently healthy subjects.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 35:347-353,1975

41. Holmgren,J.,Smith,J.W.:
Immunological aspects of urinary tract infections.
Progr.Allergy 18:289-352,Karger,Basel,1975

42. Kashket,S.,Donaldson,C.G.:
Saliva-induced aggregation of oral streptococci.
J.Bact. 112:1127-1133,1972

43. Kienitz,M.:
In: Hahnenklee-Symposion 1976. Pyelonephritis.
Eds.: Kienitz,M.,Knothe,H.,Losse,H.,Naumann,P., Schönfeld,H.; Editiones 'Roche',1976

44. Köllermann,M.W.,Scherf,H.,Schwarke,D.:
Untersuchungen über die Besiedelung der periurethralen Schleimhäute mit potentiell uropathogenen Keimen (Darmbakterien) bei urologisch gesunden Probanden.
Mschr.Kinderheilk. 125:137-141,1977

45. Langman,J.:
Medizinische Embryologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1976

46. Marget,W.,Reindke,B.:
Neuere Beobachtungen zur Frage der Pathogenese der nichtobstruktiven chronischen Harnwegsinfektionen.
Med.Klin. 69:1767-1773,1974

47. Marsh,F.P.,Murray,M.,Panchamia,P.:
The relationship between bacterial cultures of the vaginal introitus and urinary infection.
Brit.J.Urol. 44:368-375,1972

48. McCabe,W.R.,Jackson,G.G.:
Treatment of pyelonephritis. Bacterial, drug and host factors in success or failure among 252 patients.
New Engl.J.Med. 272:1037-1044,1965

49. McGale,E.H.F.:
Protein-carbohydrate compounds in human urine.
In: Eds. Wolfrom,M.L.,Tipson,R.S.:
Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 24:435,1969

50. Metzger:
Bakteriologische Fragen bei der Blasen-manometrie.
Diss.München 1979

51. Miller,T.E.,Burnham,S.,North,J.D.K.:
Immunological enhancement in the pathogenesis of pyelonephritis.
Clin.exp.Immunol. 24:336-345,1976

52. Miller,T.E.,Burnham,S.,Simpson,G.:
Selective deficiency of thymus-derived lymphocytes in experimental pyelonephritis.
Kidney int. 8:88-97,1975

53. Monis,B.,Zambrano,D.:
Ultrastructure of transitional epithelium of man.
Z.Zellforsch. 87:101-117,1968

54. Norden,C.W.,Green,G.M.,Kass,E.H.:
Antibacterial mechanisms of the urinary bladder.
J.clin.Invest. 47:2689-2699,1968

55. Oehme,J.,Meyer-Beeck,D.:
Immunglobuline im Serum bei chronischer Pyelonephritis.
Klin.Wschr. 47:387-388,1969

56. O'Grady,F.W.,Richards,B.,McSherry,M.A.,O'Farrell,S.M., Cattel,W.R.:
Introital enterobacteria, urinary infection, and the urethral syndrome.
Lancet 1208-1210,1970

57. Petersen,J.D.,Nehrlich,S.,Oyer,P.E.,Steiner,D.F.:
Determination of the amino acid sequence of the monkey, sheep and dog proinsulin C-peptides by a semi-micro Edman degradation procedure.
J.biol.Chem. 247:4866-4871,1972

58. Porter,W.H.:
Application of nitrous acid deamination of hexosamines to the simultaneous GLC determination of neutral and amino sugars in glycoproteins.
Analyt.Biochem. 63:27-43,1975

59. Salit,I.E.,Gotschlich,E.C.:
Type I Escherichia coli pili: Characterization of binding to monkey kidney cells.
J.exp.Med. 146:1182-1194,1977

60. Schauer,R.:
Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren.
Angew.Chem. 85:128-140,1973

61. Schauer,R.:
Der Einfluß von Acylneuraminsäuren auf die Struktur und Funktion von Glykokonjugaten.
Z.physiol.Chem. 358:296-297,1977

62. Sohl Akerlund,A.,Ahlstedt,S.,Hanson,L.A.,Jodal,U.:
Urine and serum antibody responses against E.coli O-antigen in childhood urinary tract infection.
Acta path.microbiol.scand. Sect.B, in press 1979

63. Spackmann,D.H.,Stein,W.H.,Moore,S.:
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Analyt.Chem. 30:1190-1206,1958

64. Springer,G.F.:
Importance of blood-group substances in interactions between man and microbes.
Ann.NY.Acad.Sci. 169:134-152,1970

65. Springer,G.F.,Schwick,H.G.,Fletcher,M.A.:
The relationship of the influenza virus inhibitory activity of glycoproteins to their molecular size and sialic acid content.
Proc.nat.Acad.Sci. 64:634-641,1969

66. Stamey,T.A.,Fair,W.R.,Timothy,M.M.,Chung,H.K.:
Antibacterial nature of prostatic fluid.
Nature 218:444-447,1968

67. Stamey,T.A.,Howell,J.J.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. IV. The role of local vaginal antibodies.
J.Urol. 115:413-415,1976

68. Stamey,T.A.,Kaufman,M.F.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. II. A comparison of growth in normal vaginal fluid of common versus uncommon serogroups of Escherichia coli.
J.Urol. 114:264-267,1975

69. Stamey,T.A.,Mihara,G.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. V. The inhibitory activity of normal vaginal fluid on proteus mirabilis and pseudomonas aeruginosa.
J.Urol. 115:416-417,1976

70. Stamey,T.A.,Mihara,G.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infection. VI. Analysis of segmented leukocytes on the vaginal vestibule in relation to enterobacterial colonization.
J.Urol. 116:72-73,1976

71. Stamey,T.A.,Sexton,C.C.:
The role of vaginal colonization with enterobacteriaceae in recurrent urinary infections.
J.Urol. 113:214-217,1975

72. Stamey,T.A.,Timothy,M.M.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. I. The role of vaginal pH.
J.Urol. 114:261-263,1975

73. Stamey,T.A.,Timothy,M.M.:
Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. III. Vaginal glycogen concentrations.
J.Urol. 114:268-270,1975

74. Stamey,T.A.,Timothy,M.,Millar,M.,Mihara,G.:
Recurrent urinary infections in adult women. The role of introital enterobacteria.
Calif.Med. 115:1-19,1971

75. Svanborg Edén,C.:
Attachment of Escherichia coli to human urinary tract epithelial cells. An in vitro test system applied in the study of urinary tract infections.
Scand.J.infect.Dis.,Suppl.15:1-69,1978

76. Svanborg Edén,C.,Eriksson,B.,Hanson,L.A.:
Adhesion of Escherichia coli to human uroepithelial cells in vitro.
Infect.Immun. 18:767-774,1977

77. Svanborg Edén,C.,Eriksson,B.,Hanson,L.A.,Jodal,U.,
Kaijser,B.,Janson,L.,Lindberg,U.,Olling,S.:
Adhesion to normal human uroepithelial cells of Escherichia coli from children with various forms of urinary tract infection.
J.Pediat. 93:398-403,1978

78. Svanborg Edén,C.,Hanson,L.A.,Jodal,U.,Lindberg,U., Sohl Akerlund,A.:
Variable adherence to normal human urinary tract epithelial cells of Escherichia coli strains associated with various forms of urinary tract infections.
Lancet II:490-492,1976

79. Svanborg Edén,C.,Hansson,H.A.:
Escherichia coli pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells.
Infect.Immun. 21:229-237,1978

80. Svanborg Edén,C.,Svennerholm,A-M.:
Secretory IgA and IgG antibodies prevent adhesion of Escherichia coli to human urinary tract epithelial cells.
Infect.Immun. (submitted)

81. Svennerholm,L.:
Quantitative estimation of sialic acids.
II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method.
Biochim.biophys.Acta 24:604-611,1957

82. Tagesson,C.:
Cellular mechanisms antagonistic to bacteria in leucocytes and urinary bladder epithelium.
Diss. Linköping University 1973

83. Tamm,I.,Horsfall,F.L.:
Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 74:108-114,1950

84. Tamm,I.,Horsfall,F.L.:
Mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and Newcastle disease viruses.
J.exp.Med. 95:71-97,1952

85. Taylor,P.W.:
Isolation and characterization of a serum antibactericidal factor.
Clin.Sci. 43:705-708,1972

86. Wichman,U.:
Parameter zur Diagnose akuter Schübe von chronischer Pyelonephritis im Kindesalter.
Diss. München 1972

87. Williams,R.C.,Gibbons,R.J.:
Inhibition of streptococcal attachment to receptors on human buccal epithelial cells by antigenically similar salivary glycoproteins.
Infect.Immun. 11:711-718,1975

88. Winberg,J.,Andersen,H.J.,Bergström,T.,Jacobson,B., Larson,H.,Lincoln,K.:
Epidemiology of symptomatic UTI in childhood.
Acta Pediat.Scand.Suppl.252,1974

89. Winterburn,P.J.,Phelps,C.F.:
The significance of glycosylated proteins.
Nature 236:147-151,1972

90. Winzler,R.J.:
Determination of serum glycoproteins.
VI. Methods for determination of serum glycoproteins. 1. Protein-bound hexose.
Meth.biochem.Anal. 2:290-292,1955

Nachtrag:

91. Köttgen,E.,Gerok,W.:
Pathobiochemische Aspekte der Wechselwirkung zwischen Glykoproteinen und Glykoproteinrezeptoren.
Med.Welt 30,1:20-29,1979

92. Köttgen,E.,Bauer,Ch.,Reutter,W.,Gerok,W.:
Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glycoproteinen
I. Grundlagen und interdisziplinäre Gesichtspunkte.
Klin.Wochenschr.57:151-159,1979

93. Köttgen,E.,Bauer,Ch.,Reutter,W.,Gerok,W.:
Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glycoproteinen
II. Ausgewählte Klinische Fachgebiete
Klin.Wochenschr.57:199-214,1979

94. Ritz,E.,Riedasch,G.:
Der rezidivierende Harnwegsinfekt. Spielen immunologische Faktoren eine Rolle?
Münch.med.Wschr.121:969-970,1979

L e b e n s l a u f

Am 23. 12. 53 bin ich als erstes Kind von Heinz und Rosemarie Hofmann in München-Schwabing geboren. Beruf meines Vaters: Oberregierungsvermessungsrat.

Nach 4-jähriger Volksschul- und 9-jähriger Gymnasialzeit am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gisela-Gymnasium München-Schwabing und Max-Planck-Gymnasium München-Pasing legte ich 1973 das Abitur ab.

Ich bekam sofort einen Studienplatz für Medizin und beendete nach 12 Semestern mit dem Staatsexamen am 7. 11. 79 mein Studium. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 14. 11. 79.

1976-79 arbeitete ich unter Prof. Dr. Marget in der Universitäts-Kinderklinik an der vorliegenden Dissertation.

Vom 3. 12. 79 bis 28. 2. 81 war ich als wehrpflichtiger Stabsarzt der Bundeswehr in Nienburg a.d.Weser eingesetzt.

Seit 1. 3. 81 habe ich eine wissenschaftliche Assistentenstelle an der chirurgischen Klinik der Universität München.